

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische
Immunologie und Rheumatologie)

**Inhibitor of Apoptosis Stimulating Protein of p53
(iASPP) in akuten myeloischen Leukämien - Expression
und Funktion des antiapoptotischen Familienmitgliedes
der ASPP-Proteinfamilie**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Bajrami Saipi, Mihada, geb. Bajrami
2022**

für meinen Sohn

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1 Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Kampa-Schittenhelm
2 Berichterstatter: Professorin Dr. J. Walz

Tag der Disputation: 26.10.2022

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 8 -
TABELLENVERZEICHNIS	- 10 -
1. EINLEITUNG	- 14 -
1.1 Akute myeloische Leukämie	- 14 -
1.1.1 Pathophysiologie der akuten myeloischen Leukämie	- 14 -
1.1.2 Diagnostik	- 16 -
1.1.3 Risikofaktoren	- 18 -
1.1.4 Klassifikation und prognostische Faktoren	- 18 -
1.1.5 Bewertung einer Remission	- 21 -
1.1.6 Therapiealgorithmus	- 22 -
1.1.7 Verlaufskontrollen	- 23 -
1.2. P53	- 24 -
1.2.1 Biochemische Struktur von p53 und ihre Bedeutung	- 24 -
1.2.2 Funktionen von p53 in der Zelle	- 24 -
1.2.3 P53-Pathway-Aktivierung	- 25 -
1.2.4 Bedeutung in malignen Neoplasien	- 26 -
1.2.5. Rolle von P53 in der AML	- 26 -
1.3. Apoptose-Stimulierende Proteine von p53 (ASPP)	- 27 -
1.3.1. Nähere Charakterisierung der ASPP-Proteinfamilie	- 28 -
1.3.2. Stellenwert der ASPPs in malignen Neoplasien	- 29 -
1.4. Fragestellung	- 30 -
1.5. Ziele dieser Dissertationsarbeit	- 31 -
2. MATERIAL UND METHODEN	- 33 -
2.1. Material	- 33 -

2.1.1.	Verwendete Geräte, Gebrauchsgüter, Zelllinien sowie Substanzen und Reagenzien	- 33 -
2.1.2.	Beschreibung der untersuchten Probandenkohorten	- 39 -
2.2.	Umgang mit Zellmaterial	- 39 -
2.2.1.	Zellkultur	- 39 -
2.2.2.	Isolation mononukleärer Zellen aus heparinisiertem Blut und Knochenmarkaspirat	- 40 -
2.2.3.	Lagerung von Zellmaterial	- 41 -
2.2.4.	Behandlung von Zellmaterial mit chemotherapeutischen Substanzen oder Tyrosinkinaseinhibitoren	- 41 -
2.2.5.	Manuelle Bestimmung der Zellproliferation	- 42 -
2.2.6.	Untersuchung der metabolischen Aktivität mittels XTT-Assay	- 43 -
2.3.	Apoptose-Assays	- 43 -
2.4.	Expressionsanalysen	- 44 -
2.4.1.	Molekulargenetische Expressionsanalyse	- 44 -
2.4.1.1.	Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA)	- 44 -
2.4.1.2.	cDNA-Synthese	- 44 -
2.4.1.3.	Quantitative Real-Time PCR (qRT- PCR)	- 46 -
2.4.2.	Proteinbiochemische Expressionsanalyse	- 48 -
2.4.2.1.	Immunphänotypisierung	- 48 -
2.5.	iASPP-silencing mittels lentiviraler genetischer Modifikation	- 49 -
2.5.1.	Expressionssuppression mithilfe von short hairpin-RNA	- 49 -
2.5.1.1.	Versuchsprinzip	- 49 -
2.5.1.2.	Plasmidpräparation	- 50 -
2.5.1.3.	Herstellung lentiviraler Vektoren (Transfektion)	- 50 -
2.5.1.4.	Lentivirale Transduktion der Zielzellen	- 51 -
2.6.	Statistische Auswertung	- 51 -
3.	ERGEBNISSE	- 52 -

3.1	Expression von iASPP in Blasten von AML-Patienten und leukämischen Zelllinien	- 52 -
3.1.1.	Patientenkohorte	- 52 -
3.1.1.1.	Patientenkohorte charakterisiert nach Alter und Geschlecht	- 52 -
3.1.1.2.	Patientenkohorte analog ELN-Risikostratifizierung	- 54 -
3.1.2.	iASPP Expression in akuter myeloischer Leukämie	- 61 -
3.1.2.1.	Durchflusszytometrische Expressionsbestimmung	- 61 -
3.1.2.2.	iASPP-Expressionsbestimmung mittels qRT-PCR	- 64 -
3.1.2.3.	Expressionsanalyse unter Berücksichtigung von Diagnose und Therapieansprechen	- 65 -
3.1.2.4.	Korrelation von iASPP-Expression und klinischen Daten	- 67 -
3.1.2.5.	Abfall der iASPP-Expression in der AML-Zelllinie Molm14 unter Applikation chemotherapeutischer Substanzen	- 73 -
3.1.2.6.	Untersuchung der iASPP-Expression in Patienten nach Beginn der Induktionstherapie	- 74 -
3.2.	Etablierung eines iASPP-knock-down (KD)-Zellmodells	- 76 -
3.3.	Die Rolle von iASPP im Molm14-AML-Zellmodell	- 81 -
3.3.1.	Supprimierung der iASPP-Expression resultiert in reduzierter Proliferation	- 81 -
3.3.2.	Supprimierung der iASPP-Expression korreliert signifikant mit höherer Apoptoseinduktion unter Chemotherapie im AML-Zellmodell	- 83 -
3.4.	Untersuchung von iASPP in der ALL-Zelllinie Jurkat	- 86 -
3.4.1.	iASPP-Suppression führt zu signifikant verminderter Proliferationskapazität	- 86 -
3.4.2.	Supprimierung der iASPP-Expression korreliert signifikant mit höherer Apoptoseinduktion unter Chemotherapie im ALL-Zellmodell	- 87 -
3.5.	Ausblick: iASPP in anderen hämatologischen Entitäten	- 90 -
4.	DISKUSSION	- 91 -

4.1. Signifikant erhöhte iASPP-Expression in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie	- 91 -
4.2. Subgruppenanalyse im Kontext mit der iASPP-Expression bei AML-Patienten	- 92 -
4.3. iASPP-Expression führt zu gesteigerter Zellproliferation	- 95 -
4.4. Erhöhte iASPP-Expression ist mit reduziertem Ansprechen auf chemotherapeutische Substanzen im Zellmodell assoziiert	- 95 -
4.5. iASPP-Expression in Patienten im Therapieverlauf	- 96 -
4.6. Probengewinnung	- 97 -
4.7. iASPP in ALL und Mastozytose	- 98 -
4.8. Résumé	- 98 -
5. ZUSAMMENFASSUNG	- 102 -
6. LITERATURVERZEICHNIS	- 104 -
7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	- 114 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatopoese des Menschen [6].....	- 15 -
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der Apoptose- stimulierenden Proteine von p53 [50]......	- 28 -
Abbildung 3: Schematische Darstellung der ASPP-Proteine und ihrer Aktivierungsmechanismen [49].....	- 30 -
Abbildung 4: Altersklassenverteilung im Patientenkollektiv	- 53 -
Abbildung 5: Altersklassenverteilung bei Erstdiagnose bzw. AML-Rezidiv in Gegenüberstellung	- 54 -
Abbildung 6: Anteilige Darstellung der Risikoklassen innerhalb des gesamten Patientenkollektivs zum Zeitpunkt der Erstdiagnose analog ELN....	- 55 -
Abbildung 7: iASPP-Expression ist in AML-Blasten signifikant erhöht	- 62 -
Abbildung 8: Mittelwert der iASPP-Expression in AML-Blasten von Patienten unterscheidet sich in Blut und Knochenmark nicht signifikant	- 63 -
Abbildung 9: Vergleich der iASPP-Expression leukämischer Blasten aus Blut und Knochenmark mit Donoren.....	- 63 -
Abbildung 10: Mittelwert der iASPP-mRNA-Expression in AML-Blasten von Patienten signifikant erhöht	- 64 -
Abbildung 11: iASPP-Expression in sekundärer AML signifikant höher als in de novo AML	- 65 -
Abbildung 12: AML-Rezidive zeigen eine signifikant höhere iASPP-Expression als de novo AML.....	- 66 -
Abbildung 13: Vergleich iASPP-Expression und Therapieansprechen	- 67 -
Abbildung 14: Niedrigere iASPP-Expression bei AML-Patienten mit günstigem Risikoprofil.....	- 68 -
Abbildung 15: iASPP-Expression korreliert invers mit der Leukozytenzahl im Blut und der Laktatdehydrogenase bei AML-Erstdiagnose.....	- 70 -
Abbildung 16: iASPP-Expression korreliert invers mit der Laktatdehydrogenase sowie dem Blastenanteil im peripheren Blut beim AML-Rezidiv.....	- 71 -
Abbildung 17: iASPP-Expression sinkt unter Behandlung mit Daunorubicin in der AML-Zelllinie Molm14.....	- 74 -

Abbildung 18: iASPP-Expression im Therapieverlauf unter Berücksichtigung des späteren Remissionsstatus.....	- 75 -
Abbildung 19: Bestimmung der iASPP-Expression mittels qRT-PCR vor Therapiebeginn und 24 Stunden nach Beginn der Induktionstherapie	- 75 -
Abbildung 20: Fluoreszenz-positive Zellen als Nachweis erfolgreicher Virusproduktion.....	- 76 -
Abbildung 21: Nachweis erfolgreicher Transduktion der Molm14-Zelllinie im Fluoreszenzmikroskop.....	- 77 -
Abbildung 22: Nachweis erfolgreicher Transduktion der Jurkat-Zelllinie im Fluoreszenzmikroskop.....	- 78 -
Abbildung 23: 99%ige Transduktionseffizienz.....	- 79 -
Abbildung 24: Signifikant supprimierte iASPP-Expression in den iASPP-KD-Zellmodellen der Zelllinien Molm14 und Jurkat	- 80 -
Abbildung 25: Signifikant verminderte Proliferationskapazität in den Molm14-iASPP-supprimierten-Zellen	- 81 -
Abbildung 26: Signifikant verminderter Metabolismus in den Molm14-iASPP-KD-Zellen im XTT	- 82 -
Abbildung 27: Signifikant höhere Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Daunorubicin und Sunitinib im iASPP-KD-Zellmodell.....	- 84 -
Abbildung 28: Signifikant geringere IC50-Konzentration im iASPP-supprimierten Zellmodell	- 85 -
Abbildung 29: Jurkat-Zellen mit supprimierter iASPP-Expression proliferieren langsamer.....	- 86 -
Abbildung 30: Signifikant verminderter Metabolismus in den Jurkat-iASPP-KD-Zellen im XTT	- 87 -
Abbildung 31: Stärkere Apoptoseinduktion im Jurkat-KD-Zellmodell nach Behandlung mit Daunorubicin und Cytarabin.	- 88 -
Abbildung 32: Signifikant niedrigere IC50-Konzentration im iASPP-KD-ALL-Modell.....	- 89 -
Abbildung 33: Signifikant erhöhte iASPP-Expression bei Patienten mit ALL und Mastozytose	- 90 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Expression verschiedener intrazellulärer bzw. extrazellulärer Cds auf Blutzellen [16].....	- 17 -
Tabelle 2: WHO-Klassifikation der AML 2017 [14]	- 18 -
Tabelle 3: Risikostratifizierung der AML analog European LeukemiaNet ELN-Klassifikation 2016 [10].....	- 20 -
Tabelle 4: Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zelllinien.....	- 40 -
Tabelle 5: Verwendete Behandlungskonzentrationen für in-vitro Apoptose-Assays	- 41 -
Tabelle 6: Schritt 1: Ansatz Template-Primer Mix	- 45 -
Tabelle 7: Schritt 2: Ansatz Mastermix.....	- 45 -
Tabelle 8: Einstellungen Thermocycler zur cDNA-Synthese.....	- 45 -
Tabelle 9: Light Cycler 480 Real-Time-PCR-Einstellungen.....	- 47 -
Tabelle 10: Reaktionsansatz qRT-PCR	- 47 -
Tabelle 11: Transfektionsreagenz	- 50 -
Tabelle 12: Deskriptive Statistik der Altersklassenverteilung bei AML- Erstdiagnose sowie AML-Rezidiv	- 53 -
Tabelle 13: Klinische Parameter der in die Patientenkohorte eingeschlossenen Probanden.....	- 56 -
Tabelle 14: Relevante Laborparameter der analysierten Patienten	- 59 -
Tabelle 15: Deskriptive Statistik der in Abbildung 15 ausgewerteten Patienten mit de novo und sekundärer AML.....	- 72 -
Tabelle 16: Deskriptive Statistik der in Abbildung 16 ausgewerteten Patienten mit AML-Rezidiv	- 72 -
Tabelle 17: Signifikant Verminderte Wachstumskonstante sowie Verdopplungszeiten des Molm14-iASPP-KD-Zellmodells	- 82 -
Tabelle 18: Berechnete IC50-Werte für das Molm14-iASPP-KD-Zellmodell	- 85 -
Tabelle 19: Reduzierte Wachstumskonstante sowie längere Verdopplungszeit des Jurkat-iASPP-KD-Zellmodells.....	- 87 -
Tabelle 20: Berechnete IC50-Werte für das Jurkat-iASPP-KD-Zellmodell ..	- 89 -

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
AraC	Cytarabin
ASPP1/2	Apoptose stimulierendes Protein von p53 1/2
ATM	ataxia teleangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and RAD3-related
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Rinderalbumin (bovine serum albumin)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDK1/2	Cyclin-abhängige Kinase 1/2 (cyclin-dependent kinase 1/2)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary deoxyribonucleic acid)
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
CR	komplette Remission (complete remission)
DAC	Decitabin
Dauno	Daunorubicin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotid
EST	Esterase
EV	Leervektor (empty vector)
FBS	Fötale Kälberserum (fetal bovine serum)
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde

HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (Hank's buffered salt solution)
iASPP	inhibitorisches Apoptose stimulierendes Protein von p53
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IL-3	Interleukin 3
KD	Knock down
kDa	Kilodalton
l	Liter
ln	natürlicher Logarithmus
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mM	millimolar
min	Minuten
ml	Milliliter
μ M	micromolar
μ mol	Micromol
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Anzahl
NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nmol	Nanomol
NR	Non-Responder
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PI	Propiumiodid
PIDD	p53-induced death domain protein 1
PIG-3	p53-inducible gene 3
POX	Peroxidase

PR	partielle Remission
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
shRNA	Short-hairpin-Ribonukleinsäure
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
U	Katal (unit)
V	Volt
WBC	Leukozytenzahl (white blood cell count)

1. Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine maligne Neoplasie der Myelopoese. Hiervon können unterschiedliche myeloische Zelllinien betroffen sein. Ohne Therapie führt die AML in den meisten Fällen innerhalb von einem Jahr zum Tod [1,2]. Nach Etablierung von Daunorubicin und Cytarabin in der Therapie der AML konnten komplette Remissionen erzielt und Langezeiterfolge verzeichnet werden [3].

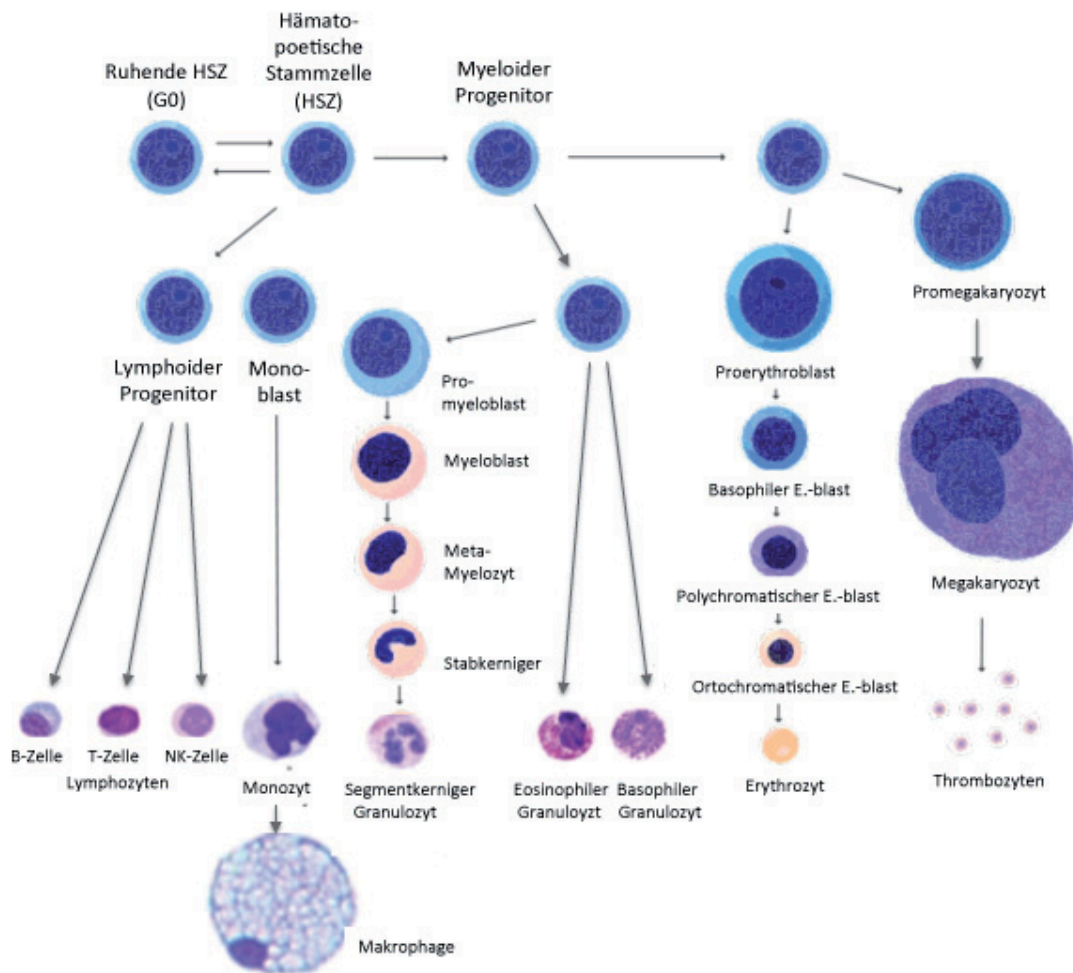
Epidemiologisch betrachtet, ist die AML mit 80% die häufigste Leukämieform im Erwachsenenalter (Kompetenznetz Leukämien, Oktober 2021 [4]). Die Inzidenz liegt bei 3,5/100.000 Neuerkrankungen im Jahr. Die Patienten sind bei Erstdiagnose im Median 65 Jahre alt. Bei Betrachtung der Geschlechterverteilung, findet sich ein geringfügig erhöhter Anteil für männliche Patienten bei eine Verhältnis von männlich : weiblich mit 1,6 : 1.

Das 5-Jahres-Überleben bei AML-Patienten über 20 Jahren liegt bei etwa 26% (Cancer.Net, Oktober 2021 [5]).

1.1.1 Pathophysiologie der akuten myeloischen Leukämie

Die Hämatopoese findet beim Menschen im Knochenmark statt. Aus einem Pool pluripotenter Stammzellen kommt es zur Ausdifferenzierung der reifen Blutzellen. Abbildung 1 zeigt hierzu eine vereinfachte Veranschaulichung.

Abbildung 1: Hämatopoese des Menschen [6]



Bei der AML kommt es zur pathologischen Expansion eines malignen myeloischen Klon, meist aus einem myeloischen Progenitor. Die unkontrollierte Proliferation dieses Klon verdrängt das gesunde Knochenmark und führt zur Beeinträchtigung der physiologischen Hämatopoese. Dadurch erklären sich die mit der AML einhergehenden Symptome wie opportunistische Infektionen, Leistungsminderung sowie Blutungen. Seit Einführung der zytogenetischen Diagnostik konnten bei der AML verschiedenste Aberrationen nachgewiesen werden. Seither ist es gelungen, zytogenetische und auch molekulargenetische Charakteristika mit prognostischen Aspekten in Verbindung zu stellen [7,8].

Es wird zwischen einer primären *de novo* akuten myeloischen Leukämie, welche ohne vorangegangene hämatologische Knochenmarks- oder Krebserkrankungen auftritt, und einer sekundären akuten myeloischen Leukämie

unterschieden [4]. Letztere ist mit Vorerkrankungen des Knochenmarks assoziiert. Häufig wird die Diagnose einer sekundären AML bei Patienten auf dem Boden eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) gestellt [9].

1.1.2. Diagnostik

Blutbild und Differentialblutbild zeigen erste Veränderungen der Hämatopoese auf. Bei Erstdiagnose weisen über die Hälfte der Patienten eine Leukozytose auf (Onkopedia Leitlinie AML, Stand April 2022 [1]). Die Durchflusszytometrie und Zytomorphologie identifizieren das Vorliegen einer klonalen Expansion. Mithilfe der Zytogenetik und Molekulargenetik können weitere Aberrationen identifiziert werden, welche u.a. auch prognostische Bedeutung haben [8].

1.1.2.1. Zytomorphologie

Bei der mikroskopischen Begutachtung des malignitätssuspekten Zellmaterials kann eine Unterscheidung zwischen myeloisch und lymphatisch bzw. chronisch und akut vorgenommen werden. Zu den gängigsten Färbemethoden der Zytomorphologie gehören die Pappenheim-Färbung sowie die POX- bzw. EST-Färbung [10].

1.1.2.2. Immunphänotypisierung

Die durchflusszytometrische Untersuchung von suspekten Zellen bezieht sich auf das Vorliegen von blastentypischen Markern auf der Zelloberfläche. Im Durchflusszytometer können die exprimierten Antigene auf Vorhandensein und Anzahl sowie die Zellen auf Größe und Granularität hin untersucht werden [10].

Cd (Cluster of differentiation)

Die Immunphänotypisierung beinhaltet bei der AML-Diagnostik zu einem überwiegenden Teil die Bestimmung von Cds. Diese Glykoproteine sind entweder zellmembrangebunden oder im Zytosol einer Zelle anzutreffen und übernehmen unterschiedliche Funktionen, beispielsweise als Rezeptoren bei der interzellulären Signaltransduktion. Tabelle 1 zeigt die relevanten Cds für die AML [11].

Tabelle 1: Expression verschiedener intrazellulärer bzw. extrazellulärer Cds auf Blutzellen [16]

Zellen	Marker
Progenitorstadium	CD34, CD117, CD10, CD38, CD117, cyTdT CD133, HLA-DR
Monozytäre Marker	CD4, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD64, CD65, CD184 (CXCR4), iMPO (intrazelluläre Myeloperoxidase), i-lysozyme
Megakaryozytäre Marker	CD41, CD42, CD61
Erythrozytäre Marker	CD235a
Leukämiespezifisches Antigen	NG2 homolog
Zelllinienaberrante Antigene	CD2, CD7, CD19, CD56
Panleukozytäre Marker	CD11a, CD45
Myeloische Reihe	iMPO oder Nachweis monozytärer Differenzierung von mind. 2 i-lysozyme, CD11c, CD14, CD64
B-lymphatische Zellreihe	CD19 mit mind. einem weiteren der folgenden Marker: iCD79a, iCD22- Wenn CD19 schwach, dann mind. 2 der genannten Kriterium erforderlich.
T-lymphatische Zellreihe	CD3 oder CD3

1.1.2.3. Zytogenetik

Für die AML sind in der Zytogenetik die FISH-Analyse sowie Chromosomenbandanalyse von Bedeutung [12]. Wesentliche Rolle spielen diese Informationen im klinischen Alltag vor allem im Rahmen der Beobachtung eines Krankheitsverlaufs und Beurteilung des Therapieansprechens.

1.1.3. Risikofaktoren

Als sichere Risikofaktoren für eine AML ist die Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung, Tabak, Mineralölprodukten, Farben, Benzolen, Pestiziden und Herbiziden sowie Äthylenoxyden bekannt [7]. Auch eine vorherige Therapie mit zytostatischen Substanzen, v.a. Alkylanzien und Topoisomerase II - Inhibitoren, können im Verlauf eine sekundäre AML bedingen. Zytogenetische Veränderungen im Rahmen einer Vorerkrankung können ebenfalls ein Risikofaktor sein, so z.B. beim MDS [9].

1.1.4. Klassifikation und prognostische Faktoren

Für die Klassifikation der AML dienen zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen. Per definitionem, liegt eine AML bei einem Blastenanteil von über 20% in Blut oder Knochenmark vor; Ausnahme ist eine AML-spezifische rekurrente Chromosomenaberration, bei deren Vorliegen das Erreichen des Grenzwertes für den Blastenanteil nicht obligatorisch ist [(Harrisons Hämatologie und Onkologie, Dan el Longo et al., 2017 [13]).

Die ehemalige FAB-Klassifikation der WHO für die AML, welche v.a. auf morphologischen Charakteristika beruhte, wurde um die Erkenntnisse der zytogenetischen, molekulargenetischen und genetischen Veränderungen erweitert. Tabelle 2 stellt die aktuelle WHO (World Health Organization) - Klassifikation der AML dar [14].

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der AML 2017 [14]

AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen

- AML mit t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
- AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
- Akute Promyelozytenleukämie (APL) mit *PML-RARA*
- AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); *KMT2A-MLLT3*
- AML mit t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*

- AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*
- AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*
- *Provisorische Entität: AML mit BCR-ABL1*
- AML mit *NPM1*-Mutation
- AML mit biallelischer *CEBPA*-Mutation
- *Provisorische Entität: AML mit mutiertem RUNX1*

AML mit Myelodysplastisch-assoziierten Veränderungen

Therapie-assoziierte myeloische Neoplasie

AML, nicht anderweitig klassifiziert (NOS)

- AML mit minimaler Differenzierung
- AML ohne Ausreifung
- AML mit Ausreifung
- Akute myelomonozytäre Leukämie
- Akute Monoblasten-/Monozytenleukämie
- Reine Erythrozytenleukämie
- Akute Megakaryoblastenleukämie
- Akute Basophilenleukämie
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Myeloisches Sarkom

Blastisch plasmazytoide dendritische Zellneoplasie

Myeloische Down-Syndrom-assoziierte Proliferation

- Transiente abnormale Myelopoese (TAM)
- Myeloische Leukämie bei Down Syndrom

Akute Leukämie mehrdeutiger Abstammung

- Akute undifferenzierte Leukämie
- Mixed-phenotype Akute Leukämie mit t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1
- Mixed-phenotype akute Leukämie mit t(v;11q23); MLL rearranged/KMT2A
- Mixed-phenotype akute Leukämie, B/myeloid, nicht anderweitig klassifiziert
- Mixed-phenotype akute Leukämie, B/myeloid, nicht anderweitig klassifiziert

Für die Prognose einer AML spielen das Alter des Patienten sowie die molekularen und zytogenetischen Veränderungen sehr wichtige Rollen. Die Einteilung der molekular-zytogenetischen Veränderungen bei Erstdiagnose einer AML erfolgt analog der European LeukemiaNet ELN (Tabelle 3) - Kriterien in drei prognostische Gruppen [10]. Hierbei werden molekular-zytogenetische Charakteristika berücksichtigt und erlauben eine Risiko- bzw. Prognoseabschätzung für den einzelnen Patienten.

Tabelle 3: Risikostratifizierung der AML analog European LeukemiaNet ELN-Klassifikation 2016 [10].

Risikogruppe analog ELN-Klassifikation	Aberrationen
günstig	<ul style="list-style-type: none"> • t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> • inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> • Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i>^{niedrig*} • Biallelisch mutiertes <i>CEBPA</i>
intermediär	<ul style="list-style-type: none"> • Mutiertes <i>NPM1</i> mit <i>FLT3-ITD</i>^{hoch*} • Wildtyp-<i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> oder mit <i>FLT3-ITD</i>^{niedrig*} (ohne ungünstige genetische Aberrationen) • t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i>[§]

	<ul style="list-style-type: none"> • Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurde
ungünstig	<ul style="list-style-type: none"> • t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> • t(v;11)(v;q23); <i>KMT2A</i>-Genumlagerung • t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> • inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2</i>, <i>MECOM (EVI1)</i> • -5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p) • komplexer Karyotyp (≥3 Aberrationen[†]) • monosomaler Karyotyp (eine Monosomie, assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder einer anderen strukturellen, chromosomalen Aberration (außer CBF-AML)) • Wildtyp-<i>NPM1</i> mit <i>FLT3-ITD</i>^{hoch*} • Mutiertes <i>RUNX1</i>[‡] • Mutiertes <i>ASXL1</i>[‡] • Mutiertes <i>TP53</i>

Als weitere prognostisch ungünstige Faktoren werden eine hohe Laktatdehydrogenase sowie eine hohe Leukozytenzahl bei Erstdiagnose angesehen [1,10,15].

1.1.5. Bewertung einer Remission

Nach Diagnosestellung und Therapiebeginn einer AML erfolgt die Bewertung des Therapieansprechens zu definierten Zeitpunkten [1].

Eine komplette Remission (CR) kann auf mehreren Ebenen bewertet werden: Morphologisch ist ein Abfall des Blastenanteils unter 5% im Knochenmark und kein Vorhandensein von Blasten im peripheren Blut bei erholter Hämatopoese als CR zu werten.

Eine molekulare komplette Remission liegt vor, wenn die bei Erstdiagnose festgestellte molekulargenetische Veränderung mittels PCR nicht mehr nachweisbar ist.

In retrospektiven Analysen ergaben sich bezüglich der unterschiedlichen CR-Qualitäten Hinweise auf eine unterschiedliche Wertigkeit: So ist eine CR ohne vollständige hämatopoetische Regeneration prognostisch ungünstiger.

Bei einer partiellen Remission (PR) ist unter Therapie eine Reduktion der Blasten auf 5-25% im Knochenmark und Abfall auf mindestens die Hälfte, verglichen mit dem Anteil zum Zeitpunkt der Diagnose, erzielt worden, ohne dass Blasten im peripheren Blut bei regenerierter Hämatopoese feststellbar sind.

Bei einem Rezidiv nach CR steigen die Blasten im Knochenmark auf über 5% an oder es liegt eine neue extramedulläre Manifestation der AML vor.

1.1.6. Therapiealgorithmus

Die Therapie einer akuten myeloischen Leukämie sollte stets an einem hämatologisch-onkologischen Zentrum stattfinden, da hier nahezu flächendeckend ein Anschluss an AML-Studiengruppen vorhanden ist.

Darüber hinaus, sollte aufgrund der breit gefächerten Subgruppen mit spezifischen genetischen Unterschieden und hierauf beruhenden Therapiestrategien, der Abschluss der Untersuchungen der relevanten Daten vor einem Therapiebeginn abgewartet werden, sofern klinisch keine akute lebensbedrohliche Situation, beispielsweise im Falle eines Tumorlysesyndroms, einer Leukostase bzw. unkontrollierten Gerinnungsaktivierung, besteht (Onkopedia Leitlinie AML, Stand April 2022 [1]).

Grundlage der AML-Therapie bildet eine Induktionschemotherapie, um eine CR zu erreichen. Die Prognoseeinschätzung hierfür ist vor allem von den vorliegenden genetischen Aberrationen abhängig [16].

Die Standardinduktionschemotherapie folgt dem 3+7 Schema. Hiernach wird zunächst über drei Tage ein Anthrazyklin, beispielsweise Daunorubicin oder Idarubicin, und dann über 7 Tage kontinuierlich Cytarabin verabreicht. Für bestimmte AML-Subgruppen werden modifizierte Induktionsschemata angewandt.

Wird eine CR erreicht, erfolgt zum Erhalt der Remission eine Konsolidierungstherapie. Diese kann mit hochdosiertem Cytarabin oder einer allogenen Stammzelltransplantation durchgeführt werden. Für Patienten mit Vorliegen einer FLT3-Mutation und erfolgreicher allogener Stammzelltransplantation konnte das Risiko eines Rezidivs durch eine Konsolidierungstherapie mit einem Tyrosinkinaseinhibitor signifikant reduziert werden [1].

Ob eine intensive Induktionstherapie trotz einem Alter von über 65 Jahren durchführbar ist, ist im Wesentlichen davon abhängig, ob eine schwerwiegende Komorbidität vorliegt, der körperliche Allgemeinzustand des Patienten es erlaubt, wie die Prognose unter Therapie ist und nicht zuletzt auch davon, ob eine intensive Therapiestrategie vom Patienten gewünscht ist [vgl. 15]. Bei Patienten über 75 Jahren wird eine Therapie im Sinne eines „best-supportive-care“-Prinzips angestrebt: Hier kommen Substanzen wie Hydroxyurea oder hypomethylierende Substanzen wie 5-Azacitidin(HMA) und Decitabin zum Einsatz. In randomisierten, placebokontrollierten Studien wurde ein Überlebensvorteil bei Kombinationstherapie mit Azacitidin und dem bcl2-Inhibitor Venetoclax in der Therapie der AML gezeigt [17].

1.1.7. Verlaufskontrollen

Zur Kontrolle der Therapieeffektivität erfolgen stets Probenentnahmen von Blut und Knochenmark. Zunächst erfolgt eine Frühpunktion zwei Wochen nach Beginn der Induktionstherapie sowie eine erneute Kontrolle nach Beendigung der Induktion bei regeneriertem Blutbild sowie vor Beginn jedes Konsolidierungszyklus. Verlaufskontrollen umfassen die zytologische und molekulargenetische Untersuchung des entnommenen Materials sowie die Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie. Bei Vorliegen einer zytogenetischen Aberration, spielt die Beobachtung der betreffenden Aberration im Verlauf eine wichtige Rolle [1,7,8,15].

1.2. P53

P53, auch als Wächter des Genoms bezeichnet [18], ist der wohl bekannteste Tumorsuppressor und nimmt einen zentralen Stellenwert in der zellulären Stressantwort, im Apoptosesignalweg sowie als Kontrollpunkt für das Tumorwachstum ein. Daher liegt ein großer Schwerpunkt der onkologischen Forschung auf den p53-abhängigen Signalwegen. Der Genlocus von *TP53* befindet sich auf Chromosom 17p13.1. Der Name geht auf die im SDS-PAGE Gel scheinbare Molekülmasse von 53 kDA zurück. Das Protein wurde 1979 unabhängig voneinander von DeLeo, Lane und Levine 1979 beschrieben. [18,19,20]. In der Vergangenheit wurde unter den Eigenschaften von p53 seine Rolle als Transkriptionsfaktor und die Bedeutung in malignen Neoplasien am Umfassendsten beleuchtet.

1.2.1. Biochemische Struktur von p53 und ihre Bedeutung

P53 ist ein nukleär lokalisiertes, instabiles Phosphoprotein und wird von der Zelle kontinuierlich gebildet und abgebaut. Es fungiert primär als Transkriptionsfaktor und verfügt hierfür über vier verschiedene Bindungsdomänen [21]: Zentral lokalisiert findet sich eine DNA-Bindungsdomäne, die an spezifische, p53-interaktionale Zielsequenzen bindet. Die Bindung an Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise MDM2, findet am N-terminalen Ende von p53 statt. Die C-terminale Domäne von p53 erkennt als Folge von Schädigung einzelsträngig vorliegende DNA.

Die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor geschieht über Oligomerisierung am C-terminalen Ende zum Tetramer und nachfolgender Bindung an p53-interaktionale Promotorsequenzen [18]. Kommt es zu einer Tetramerbildung aus mutierten p53-Untereinheiten, resultiert dies in einer Konformationsänderung, die eine DNA-Bindung nicht mehr erlaubt. Folge ist der Funktionsverlust von p53 [21].

1.2.2. Funktionen von p53 in der Zelle

P53 fungiert vor allem nach DNA-Schädigung als Transkriptionsfaktor für Gene, die an der Apoptose, der DNA-Reparatur sowie dem Zellzyklus beteiligt sind und

bindet mit seiner zentral lokalisierten DNA-Bindungsdomäne an entsprechende p53-interaktionale Promotorsequenzen [21].

Die p53-Expression wird über eine negative Rückkopplung durch den p53-Inhibitor MDM2 gesteuert [22].

Kommt es in einer Zelle zu einer DNA-Schädigung, wird p53 in der Zelle akkumuliert [23]. Folge hiervon ist der Zellzyklusarrest, eingeleitet durch die p53-induzierte Transkription von p21 [24]. Dadurch entsteht ein Zeitfenster, in dem die fehlerhafte DNA nicht weiter amplifiziert wird und DNA-Reparaturmechanismen initiiert werden können.

Wenn DNA-Schäden große irreparable Ausmaße haben, so wird über p53 der Apoptosesignalweg ausgelöst [23,25]. Diese Zellen, die eine irreparable Schädigung tragen und das Potenzial für eine maligne Entartung innehaben, gehen in einen Prozess des kontrollierten Zelltodes ein [25]. Dies geschieht über Induktion von proapoptotischen Targetgenen wie beispielsweise *BAX* und *PIG-3*.

1.2.3. P53-Pathway-Aktivierung

Unter physiologischen Bedingungen und Abwesenheit von Noxen, liegt p53 in einer intakten Zelle inaktiv durch Inhibition von MDM2 vor [26]. Die Aktivierung von p53 erfolgt, wenn eine Zelle gegenüber starken toxischen Reizen oder UV-Strahlung exponiert ist und es infolgedessen zu DNA-Schäden kommt [23,26]. Es kommt im Folgenden zur Phosphorylierung von p53 durch die ATM-Kinase (*ataxia telangiectasia mutated kinase*), deren Induktion bei DNA-schädigenden Prozessen stattfindet. Die Phosphorylierung bewirkt eine Modifikation des Konformationszustandes von p53, wobei die aktivierte Form des Moleküls nach Abdiffusion von MDM2 vorliegt. Durch diesen Mechanismus ist eine rasche Spiegelanhebung von p53 in der Zelle möglich.

Darüber hinaus, fungiert p53 selbst als Transkriptionsfaktor und kann über Bindung an Promotoren und daraufhin folgender Transkriptionsaktivierung proapoptotischer Gene die Apoptose initiieren [22,25,26]. Gene mit

entsprechender Bindungsstelle in der DNA und Funktion sind beispielsweise *PIG-3* (*p53-inducible gene3*), *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) und Mitglieder der Bcl2-Proteinfamilie.

Neben seinen Eigenschaften als Transkriptionsfaktor, ist p53 zudem in der Lage, durch direkte Protein-Protein-Interaktion, beispielsweise mit Mitgliedern der Bcl2-Familie sowie den ASPP-Proteinen, eine schnelle Apoptoseeinleitung auszulösen [27].

1.2.4. Bedeutung in malignen Neoplasien

Bei einer Vielzahl maligner Tumorentitäten konnte eine *TP53*-Mutation nachgewiesen werden [28 - 31]. Zum überwiegenden Teil handelt es sich hierbei um Punktmutationen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen [26]. Folge sind ausbleibende DNA-Reparatur bei DNA-Schäden sowie die fehlende Apoptoseeinleitung. Letzte Konsequenz hiervon sind unkontrollierte Zellproliferation und maligne Entartung [23,26].

1.2.5. Rolle von P53 in der AML

TP53-Mutationen gehören zu den häufigsten genetischen Aberrationen in somatischen Zellen, die im Verlauf zu einer Tumorerkrankung führen [32]. In über 50% der Tumorentitäten zeigt sich eine Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53*. Obwohl p53 bei sehr vielen Tumorentitäten eine Rolle spielt [28 - 32], zeigen nur 5-10% der Patienten mit AML eine inaktivierende Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* [33 - 38]. Die häufigste Konstellation hierbei ist das Auftreten einer sekundären Leukämie auf dem Boden eines MDS [35,36]. Beim überwiegenden Teil der *de novo* AML-Patienten liegt *TP53* Wildtyp vor.

Die wissenschaftliche Untersuchung von weiteren hieran beteiligten Proteinen und Bindungspartnern, welche trotz erhaltener Funktion von p53 selbst dennoch eine Dysregulierung des Signalweges mit hieraus resultierender Inhibierung der Apoptosekaskadeninduktion bewirken und somit eine maligne Transformation gesunder Zellen nach sich ziehen können, kann daher bedeutende Aspekte für das Verständnis von Leukämieerkrankungen bieten.

Die Apoptose-stimulierenden Proteine von p53 (ASPP) gehören zu diesen potenziell relevanten Bindungspartnern von p53, die möglicherweise Aufschluss über noch offene Fragen in Diagnostik und Therapie der AML bieten könnten.

1.3. Apoptose-Stimulierende Proteine von p53 (ASPP)

Die Apoptose-stimulierenden Proteine von p53 (ASPP) sind eine Proteinfamilie, welche drei Proteine umfasst: Zwei proapoptotische Proteine, ASPP1 und ASPP2, und ein inhibitorisches Protein, iASPP. Die ASPP-Proteinfamilie erweckt hohes Interesse, zumal sie eine Ansatzstelle für die Aktivierung bzw. Inaktivierung des p53-Pathways darstellt.

Samuels-Lev et. al [39] haben gezeigt, dass die ASPP-Proteinfamilie regulatorische Funktionen bei der Interaktion von p53 mit Promotoren von proapoptotischen Genen aufweisen und somit maßgeblichen Einfluss auf das weitere Schicksal der Zelle haben. Die Mitglieder der ASPP-Proteinfamilie binden mit ihrer C-terminalen Bindungsdomäne an die DNA-Bindungsdomäne von p53 [40]. ASPP1 und ASPP2 induzieren die Transaktivierungsfunktion aller Mitglieder der p53-Proteinfamilie, p53, p63 und p73 [39,41]. Trigiante et. al zeigt in seiner Übersichtsarbeit, dass die ASPP-Proteinfamilie selektiven Einfluss auf die Funktion von p53 in der Apoptose, jedoch nicht auf jene in der Zellzyklusarrestfunktion, ausübt [42].

iASPP als alleiniger inhibitorischer Gegenpart, fungiert als Suppressor von p53 [40]. Bergamaschi et al. zeigten, dass es sich bei iASPP um ein evolutionär hoch konserviertes Molekül handelt. Seine RNA-vermittelte Inhibition führt zur p53-abhängigen Apoptoseinitiierung. Es ist zudem in der Lage, als Onkoprotein zu interagieren, beispielsweise mit dem Protoonkogen Ras. Dies ist bei Vorliegen einer Mutation von *TP53* mit p53 allerdings nicht möglich. Zudem zeigten Untersuchungen, dass es keinen nennenswerten Effekt auf die p53-abhängige Einleitung des Zellzyklusarrests hat, beispielsweise über p21[40]. Eine gesteigerte iASPP-Expression war zudem mit einer reduzierten

Apoptoseinduktion nach Behandlung von Zellkulturen mit Cisplatin und UV- Bestrahlung assoziiert [40,41].

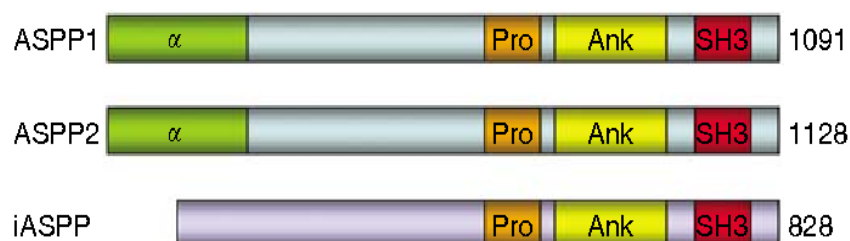
Die genannten Aspekte und die Beobachtung, dass die Familienmitglieder der ASPP-Proteinfamilie in diversen Tumorentitäten eine deregulierte Expression aufweisen [40 - 49], sowie die Tatsache, dass eine reduzierte Signalwegaktivierung trotz fehlender inaktivierender *TP53*-Mutation zu beobachten ist [42,40], verleiten zu der Hypothese, dass in der ASPP-Proteinfamilie möglicherweise ein wichtiger Ansatzpunkt für das Verständnis der Funktionsstörung des p53-Pathways bei fehlender Mutation von *TP53* liegt.

1.3.1. Nähere Charakterisierung der ASPP-Proteinfamilie

Die ASPP-Proteinfamilie umfasst zwei proapoptotische Proteine sowie ein inhibitorisches Protein.

Die drei Proteine weisen am C-terminalen Ende hohe strukturelle Ähnlichkeiten auf: Alle drei Proteine zeigen hier eine SH3-Domäne, gefolgt von einer ankyrin- und prolinreichen Domäne. Die Interaktion mit p53 erfolgt in diesem Bereich über die Ankyrin-Wiederholungs- bzw. SH3-Domäne [51]. Die strukturellen Unterschiede liegen im N-Terminus: Während ASPP1 und ASPP2 hier eine α – helikale Domäne aufweisen, ist dies für iASPP nicht der Fall. Ein weiterer Unterschied liegt bei der Aminosäurenlänge der einzelnen Proteine, wobei iASPP das kürzeste und ASPP2 das längste Protein innerhalb der ASPP-Proteinfamilie sind (Abbildung 2).

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der Apoptose-stimulierenden Proteine von p53 [50].



Von links nach rechts: α = α -Helix-Domäne; Pro = prolinreiche Domäne; Ank = Ankyrin-Wiederholungsdomäne, SH3 = SH3-Domäne; Ziffer: Aminosäurenlänge.

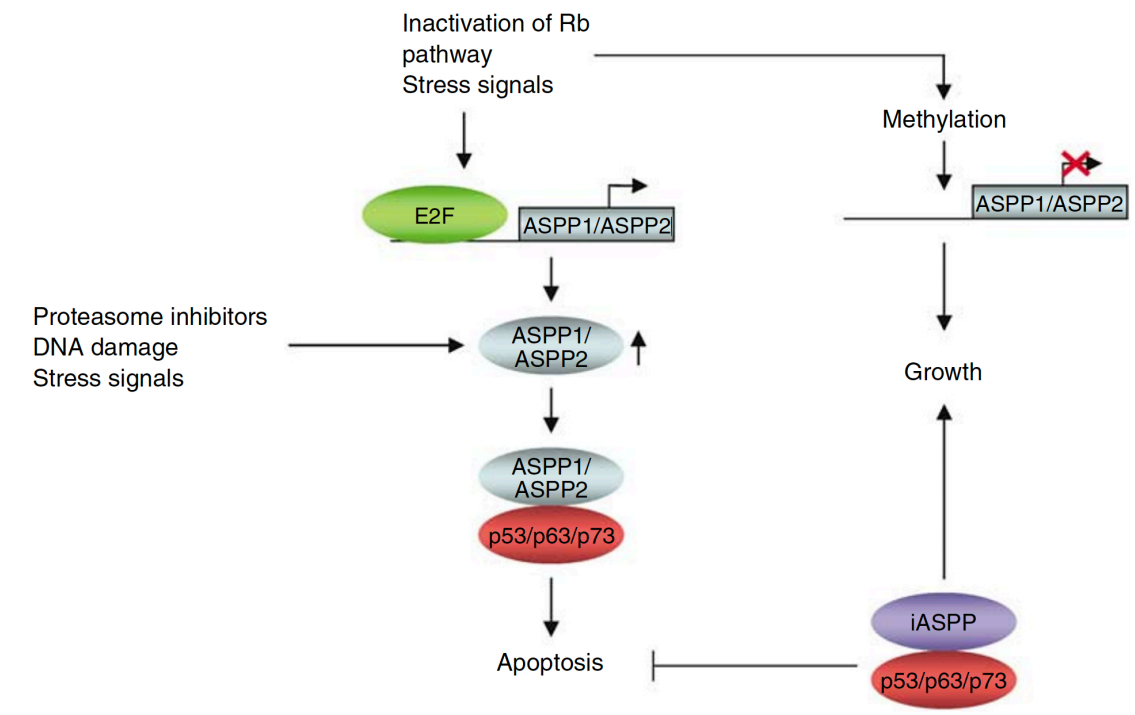
Von iASPP sind bislang drei verschiedenen Splicevarianten beschrieben worden [51,52]. Slee et al. entdeckten eine iASPP-Isoform mit deutlich größerer Proteinlänge, welche sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma der Zelle anzutreffen ist [51]. Später gelang es der Arbeitsgruppe um Zhang et al. eine weitere, primär im Nucleus lokalisierte Isoform von iASPP zu identifizieren [52]. Im Zytoplasma liegt iASPP als Dimer vor, sodass seine p53-Bindungsdomäne blockiert und eine nukleäre Translokation nicht möglich ist [53].

1.3.2. Stellenwert der ASPPs in malignen Neoplasien

Aufgrund ihrer Beteiligung am Apoptosesignalweg und Zellwachstum, ist die ASPP-Proteinfamilie von hohem wissenschaftlichem Interesse [39,42,49]. Abbildung 3 zeigt, wie die Tumorsuppressoren ASPP1 und ASPP2 und das Protoonkogen iASPP aktiviert, respektive inhibiert werden [49].

Hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens konnten in zahlreichen publizierten Arbeiten aberrante Expressionsmuster der ASPP-Proteine in diversen Tumorentitäten gezeigt werden [40 - 49].

Abbildung 3: Schematische Darstellung der ASPP-Proteine und ihrer Aktivierungsmechanismen [49]



Die Aktivierung der Tumorsuppressoren ASPP1 und ASPP2 erfolgt direkt über DNA-Schädigung, E2F-Transkriptionsfaktor und Proteasominhibition [42].

Speziell für die AML konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe eine aberrante ASPP2-Expression gezeigt werden [65]. Für iASPP gibt es bis dato wenige Daten.

1.4. Fragestellung

Die akute myeloische Leukämie ist weiterhin die häufigste hämatologische Neoplasie mit Todesfolge [1-5]. Trotz der vergleichsweise hohen Patientenzahl und etablierten Therapieregimen bis hin zur allogenen Stammzelltransplantation als kurativen Therapieansatz, verläuft die Erkrankung weiterhin in vielen Fällen tödlich.

Welche Aspekte den therapeutischen Erfolg beeinflussen und inwiefern Sie von Seiten der Medizin modifiziert bzw. zum Vorteil genutzt werden können, ist bis dato leider noch ungenügend verstanden.

In bestimmten Fällen fehlt es heutzutage weiterhin an suffizienten Markern, deren Messung im klinischen Alltag Rückschlüsse auf den Therapieverlauf bzw. das Therapieansprechen zu einem frühen Zeitpunkt oder gar eine rasche Risikobewertung bei Erstdiagnose erlauben.

Im Unterschied zu vielen anderen malignen Entitäten, liegt bei den meisten *de novo* AML-Formen die Wildtypform von *TP53* vor.

Aufgrund dieser Tatsache ist es wichtig zu verstehen, auf welchem Wege eine Inaktivierung des p53-Signalweges und die hieraufhin folgende maligne Entartung zum leukämischen Klon geschieht. Die Kenntnis hierüber könnte neue potenziell hochrelevante Aspekte für die Therapie von akuten myeloischen Leukämien bieten.

Die Apoptose-Stimulierenden Proteine von p53 könnten insbesondere auf die zuletzt genannte Frage eine Antwort bieten. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe um Kampa-Schittenhelm et al. und weiteren wissenschaftlichen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Mitglieder der ASPP-Proteinfamilie in AML-Patienten einer Dysregulation unterliegen [62,63,65].

1.5. Ziele dieser Dissertationsarbeit

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde die Rolle von iASPP in akuten myeloischen Leukämien untersucht.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine Dysregulation für ASPP2 in der AML gezeigt werden [65]. Auch für ASPP1 sind kongruente Daten für die ALL publiziert worden [64] und konnten in unserer Arbeitsgruppe für die AML gezeigt werden [66]. Daher wurde postuliert, dass unter Berücksichtigung der physiologischen Funktion von iASPP, eine erhöhte iASPP-Expression bei der AML zu erwarten ist und dass dieser Einfluss auf das Therapieansprechen haben würde.

Hierzu erfolgte initial die Messung der iASPP-Expression mithilfe von qRT-PCR sowie Durchflusszytometrie. Die Expressionsmuster der Patienten wurden mit denen von gesunden Knochenmarkspendern verglichen und im weiteren Verlauf unter Berücksichtigung bzw. Kategorisierung von phänotypischen Merkmalen analysiert.

Die Funktion von iASPP in leukämischen Blasten wurde mithilfe eines lentiviralen knock-down-Modells untersucht. Hierfür wurde ein entsprechendes Zellmodell etabliert und das Wachstumsverhalten der transduzierten Zellen sowie deren Ansprechen auf Applikation von chemotherapeutischen Substanzen bestimmt. Die erhobenen Daten sollen dem Verständnis der Rolle von iASPP in Entstehung und Therapie von akuten myeloischen Leukämien dienen und waren das primäre Ziel dieser Dissertationsarbeit.

Die hier erhobenen Daten sowie weiterführende Untersuchungen können dazu beitragen, dass iASPP als früher prognostischer Marker für ein etwaiges Therapieansprechen bei der AML im klinischen Alltag Bedeutung findet. Das Verständnis der Rolle von iASPP sowie die exakte Interaktion und Funktion des Proteins im p53-Signalweg bieten zudem neue klinisch relevante Aspekte.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Geräte, Gebrauchsgüter, Zelllinien sowie Substanzen und Reagenzien

Reagenzien

Annexin V Binding Buffer (10x)	Becton Dickinson	Fanklin Lakes, USA
APC Annexin V	Becton Dickinson	Fanklin Lakes, USA
Albumin Fraktion V	Roth	Karlsruhe, D.
Alpha-Medium	Biochrom	Berlin, D.
Ampicillin	Life Technologies	Carlsbad, USA
Aprotinin	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Biocoll-Trennmedium	Biochrom	Berlin, D.
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad	Hercules, USA
Cytarabin	Cell Pharm	Bad Vilbel, D.
Daunorubicin	Pfizer	New York, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
dNTP-Lösung	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom	Berlin, D.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

Ethanol	Merck	Darmstadt, D.
Fötales Kälberserum	Capricorn Scientific	Ebsdorfergrund, D.
Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Glycin	BioRad	München, D.
LB Broth	Life Technologies	Carlsbad, USA
Leupeptin	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Light Cycler 480 Probes Master	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Methanol	Merck	Darmstadt, D.
Nicht-essentielle-Aminosäuren- Lösung (100X)	Life Technologies	Carlsbad, USA
Normal Mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Page Ruler Plus	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PBS	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
PBS (10x)	Life Technologies	Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin, D.
Pepstatin	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Pefabloc	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Phenazinmethosulfat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Phosphate Inhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
PPI	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Primer random	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Propidiumiodid	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

Protector RNase Inhibitor	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Puromycin	Life Technologies	Carlsbad, USA
Rinderalbumin	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
RPMI-Medium 1640 + GlutaMAX-I	Life Technologies	Carlsbad, USA
RNase freies Wasser	Qiagen	Venlo, Niederlande
NaF (0,5 M)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Natriumpyrophosphat (0,2 M)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Natriumpyruvat-Lösung	Life Technologies	Carlsbad, USA
Transcriptor Reverse Transkriptase	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Transcriptor RT Reaction Buffer (5x)	Roche	Rotkreuz, Schweiz
Tris	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Biochrom	Berlin, D.
Tween 20	Roth	Karlsruhe, D.
XT Reducing Agent	BioRad	München, D.
XT Sample Buffer	BioRad	Hercules, USA
XT Tricine Running Buffer	BioRad	Hercules, USA
XTT Sodium Salt	AppliChem	Darmstadt, D.

Kits

Fix and Perm Kit	An der Grub	Österreich
PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit	Life Technologies	Carlsbad, USA

RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen	Venlo, Niederlande
QIAshredder	Qiagen	Venlo, Niederlande
Trans-Lentiviral shRNA Packaging Kit	GE Dharmacon	Lafayette, USA

Glycerolstocks

iASPP human GIPZ shRNA	GE Dharmacon	Lafayette, USA
Empty Vector Control GIPZ shRNA	GE Dharmacon	Lafayette, USA

Gebrauchsgüter

Criterion XT Precast Gel (7% Tris-Acetate)	BioRad	Hercules, USA
Criterion Blotter Filterpapier	BioRad	Hercules, USA
Erlenmeyerkolben 500 ml		
FACS-Röhrchen 5 ml	Corning	New York, USA
Kryoröhrchen 2 ml	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Netzgerät: BioRad PowerPac	BioRad	Hercules, USA
Nitrocellulosemembran 0,2µm	GE Healthcare	Chicago, USA
Zählkammer nach Neubauer	Roth	Karlsruhe, D.
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Corning	New York, USA
Zellkulturflaschen 275 ml	Corning	New York, USA
Zellkulturplatte (6-Well)	Corning	New York, USA

Antikörper

Anti-iASPP (Artikel-Nr.: A4605)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
------------------------------------	---------------	----------------

Anti- α -Tubulin (Artikel-Nr.: 3873S)	Cell Signaling	Danvers, USA
Anti-Mouse IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment, Alexa Flour® 488 Conjugate (Artikel-Nr.: 4408)	Cell Signaling	Danvers, USA
Anti-Mouse IgG 800 CW (Artikel-Nr.: 926322110)	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
Anti-Mouse IgG 680 RD (Artikel-Nr.: 92668070)	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
Anti-Goat IgG 800CW (Artikel-Nr.: 92632214)	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
Mouse Anti-Human CD34 (Artikel-Nr.: 345804)	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Mouse Anti-Human CD45 (Artikel-Nr.: 555483)	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Goat anti-Human IgG F(ab') ₂ Secondary Antibody	Thermo Scientific	Fisher Waltham, USA

Primer und Probes

iASPP forward Primer (5'-CCCCATCACTGAGGGATCT - 3')	Eurofins	Luxemburg, Luxemburg
iASPP reverse Primer (5'-AGCACAGAGCGCATCTCC-3')	Eurofins	Luxemburg, Luxemburg
iASPP Sonde (Probe #24, Universal Probe Library)	Roche	Rotkreuz, Schweiz
GAPDH Sonde (Probe #60, Universal Probe Library)	Roche	Rotkreuz, Schweiz
GAPDH reverse Primer (5'-GCCCAATACGCCCAAATCC- 3')	Eurofins	Luxemburg, Luxemburg

GAPDH forward Primer
(5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-
3')

Eurofins

Luxemburg,
Luxemburg

Zelllinien

293T
(DSMZ-No.: ACC 635)

Thermo Fisher
Scientific

Waltham, USA

Jurkat
(DSMZ-No.: ACC 282)

DSMZ

Braunschweig, D.

Molm14
(DSMZ-No.: ACC 777)

DSMZ

Braunschweig, D.

Geräte

CO₂-Brutschrank (HERA cell
240i)

Heraeus

Hanau, D.

Durchflusszytometer
FACSCalibur®

Becton Dickinson

Fanklin Lakes,
USA

Fluoreszenzmikroskop (Zeiss
Observer Z1)

Carl Zeiss AG

Oberkochen, D.

Gefrierschrank (-80°C)

Sanyo

Osaka, Japan

Infrarot-Imaging-Gerät (LI-COR
Odyssey)

LI-COR Biosciences

Lincoln, USA

Inkubationsschüttler (Innova 44)

New Brunswick
Scientific

Edison, USA

Light Cycler 480

Roche

Rotkreuz, Schweiz

Sterilwerkbänke (HERA safe)

Heraeus

Hanau, D.

Zentrifuge (Varifuge 3.0RS)

Heraeus

Hanau, D.

Software

CellQuest Pro™	Becton Dickinson	Fanklin Lakes, USA
Image Studio™	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
LightCycler® 480 Software	Roche	Rotkreuz, Schweiz
GraphPad Prism	GraphPad Software	Fay Avenue, USA
AxioVision	Carl Zeiss AG	Oberkochen, D.

2.1.2. Beschreibung der untersuchten Probandenkohorten

Es erfolgte die kontinuierliche Probensammlung und Isolierung (Ficoll-Hypaque Dichte-zentrifugation) von leukämischen Blasten aus peripherem Blut und Knochenmark von Patienten, die an einer akuten myeloischen Leukämie erkrankt sind. Die Proben wurden im Rahmen der Routinediagnostik und mit dem Einverständnis der Patienten nach deren Aufklärung gewonnen. Ein Ethikantrag wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen mit der Projektnummer 405/2006BO2 genehmigt. Die Probenentnahme erfolgte in Kooperation mit der Abteilung II der Inneren Medizin der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen. Das entnommene Material wurde unverzüglich weiterverarbeitet. Die Probenentnahmezeitpunkte waren bei Erstdiagnose einer AML bzw. eines AML-Rezidivs vor Therapiebeginn. Zur Verlaufsbeurteilung der Expressionsmuster, wurden zudem, bei ausreichendem Blastenanteil, Proben alle 24 Stunden nach Beginn der Induktionschemotherapie gewonnen. Als gesunde Kontrollkohorte dienten Knochenmarkaspirate gesunder Knochenmarkspender.

2.2. Umgang mit Zellmaterial

2.2.1. Zellkultur

Die für die Experimente verwendeten Zelllinien wurden unter den in Tabelle 4 aufgeführten Bedingungen kultiviert. Das RPMI- und DMEM-Medium wurde dafür

mit jeweils 1% Penicillin/Streptomycin, Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren versetzt.

Tabelle 4: Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Wachstumseigenschaft	Kulturmedium
293T	adhärent	DMEM-Vollmedium + 20% FBS
Jurkat	Suspension	RPMI-Vollmedium + 10% FBS
Molm14	Suspension	RPMI-Vollmedium + 10% FBS

Die Zellen wurden in geeigneten Kulturflaschen in Abhängigkeit von der Größe letzterer unter sterilen Bedingungen kultiviert. Im Falle von 75cm²-großen Kulturflaschen wurden 10-12 ml Nährmedium, im Falle von 25cm²-großen Kulturflaschen 5-8 ml Nährmedium benötigt. Die nicht-adhärenenten Zelllinien wurden jeweils nach 48-72 Stunden passagiert und mit neuem Nährmedium versetzt. Die adhärenent wachsenden 293T-Zellen wurden bei Erreichen einer 80%igen Konfluenz passagiert. Das Passagieren der Zelllinien erfolgte jeweils in einem Verhältnis von 1:5 mit frischem Nährmedium. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Laminar-Flow-Werkbank und sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.2. Isolation mononukleärer Zellen aus heparinisierem Blut und Knochenmarkaspirat

Die Isolation von mononukleären Zellen erfolgte mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurden die Proben mit sterilem PBS versetzt und in einem Falconröhrchen auf 15ml Biocoll-Trennlösung unter Bildung einer biphasischen Lösung überführt. Anschließend wurde Letztere bei 2000 min⁻¹ für 20 min ohne Abbremsung am Ende zentrifugiert, sodass eine triphasische Auftrennung erreicht wurde. Die mononukleären Zellen, welche sich nach Auftrennung in der mittleren Schicht befinden, wurden entnommen und in

PBS in mehreren Zentrifugationsschritten gewaschen und als Zellpellet für die vorgesehenen Experimente verwendet.

2.2.3. Lagerung von Zellmaterial

Zellmaterial von Patienten und Knochenmarkspendern wurden präferenziell direkt nach Isolation für die Versuche weiterverwendet. Gelingt das nicht, wurde das isolierte Zellmaterial eingefroren. Eine analoge Handhabung wurde für die verwendeten Zelllinien eingehalten. Das Zellmaterial wurde in einer Dichte von 1×10^7 /ml bei -80°C aufbewahrt. Hierfür setzte sich das Einfriermedium wie folgt zusammen: 50% Medium, 40% FBS und 10% DMSO. Für Primärmaterial wurde DMEM-Medium präferiert, für die Zelllinien das entsprechende Nährmedium der Zellkultur.

2.2.4. Behandlung von Zellmaterial mit chemotherapeutischen Substanzen oder Tyrosinkinaseinhibitoren

Die Behandlung der Zelllinien erfolgte in 2ml Medium in 6-Well-Platten. Die entsprechenden Konzentrationen der verwendeten Substanzen sind Tabelle 5 aufgeführt. Die Inkubationszeit der jeweils applizierten Substanz betrug 48 Stunden. Als Negativkontrolle diente ein unbehandeltes Well. Im Anschluss erfolgte die weiterführende Untersuchung der behandelten Zellen. Die Versuche wurden jeweils mindestens in Triplikaten durchgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Behandlungskonzentrationen für in-vitro Apoptose-Assays

Therapeutikum	Zelllinie	Konzentration				
Cytarabin [nmol/l]	Jurkat	200	425	850	2000	4000
Daunorubicin [nmol/l]	Jurkat, Molm14	25	50	75	100	250
Sunitinib [nmol/l]	Molm14	10	50	100	250	500

2.2.5. Manuelle Bestimmung der Zellproliferation

Um die Proliferationskapazität zu bestimmen, wurde zu einem definierten Startzeitpunkt eine definierte, an die Zelllinie adaptierte Zellzahl in 15 ml Nährmedium gegeben (zwischen 30000 und 50000 Zellen pro Mikroliter). An den Folgetagen wurde in festen 24 Stunden-Intervallen die Zellzahl manuell mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop bestimmt.

Die Auszählung in der Neubauer-Zählkammer erfolgte nach Auftragen von 20µl der zu quantifizierenden Zellsuspension und Zellzahlbestimmung der vier großen äußeren Quadrate. Im nächsten Schritt wurde folgende Formel zur Zellzahlbestimmung angewandt:

$$\frac{\Sigma (\text{Zellzahl aller Quadrate})}{4} = \frac{\text{Mittelwert Zellzahl}}{\text{Quadrat}}$$

$$\frac{\text{Mittelwert Zellzahl}}{\text{Quadrat}} \times 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \times \text{Volumen}_{\text{Zellsuspension}} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Die auf diese Weise erhaltenen Zellzahlen wurde im nächsten Schritt zur Bestimmung der Zellverdopplungs- bzw. Generationszeit analog folgender Formel angewandt:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{k}$$

Legende: t_d = Zellverdopplungszeit, k =Wachstumskonstante, \ln = natürlicher Logarithmus.

Um die Wachstumskonstante zu bestimmen, wird der Logarithmus der Zellzahl gegen die Beobachtungszeit aufgetragen.

$$k = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{t - t_0}$$

Legende: t_0 = Versuchsbeginn, t = Beobachtungszeitpunkt, k =Wachstumskonstante, \ln = natürlicher Logarithmus, N_0 = Zellzahl zu Versuchsbeginn, N_t = Zellzahl zum Zeitpunkt t .

Auf diese Weise ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der Wachstumskonstante entspricht. Grundlage für die Bestimmung der Verdopplungszeit auf diesem Wege, ist die Annahme eines exponentiellen Wachstums in der Beobachtungszeit unter den zu diesem Zeitpunkt bestehenden Bedingungen.

2.2.6. Untersuchung der metabolischen Aktivität mittels XTT-Assay

XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz) wird in Verbindung mit Phenazin-Methosulfat (PMS) zur Darstellung der metabolischen Aktivität von Zellen verwendet. XTT wird hierbei durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem wasserlöslichen Formazan reduziert, welches optisch durch einen Farbumschlag charakterisiert ist. Die Messung der Absorption erlaubt eine kolorimetrische Quantifizierung der metabolisch aktiven Zellen (Scudiero et. al, 1988 [68]). Die Versuchsdurchführung erfolgte analog des Protokolls für das XTT Cellular Proliferation Kit (Sigma Aldrich, USA). Hierbei wurden 30000 der zu untersuchenden Zellen in jedes Well einer 96-Well-Platte in 100µl Kulturmedium ausgesät. Nach definierten 24-stündigen Zeitintervallen erfolgte die Zugabe des Färbereagens, bestehend aus 50 µl XTT-Lösung (1 mg/ml) und 1 µl Phenazinmethosulfat-Lösung (1,25 mM). Nach 4-stündiger Inkubation wurde die Extinktion mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Zellfreies Medium diente als Referenz des Experiments und zur Normierung der Messung. Für jeden Zeitpunkt wurden jeweils 6 Replikate analysiert.

2.3. Apoptose-Assays

Die Apoptoseinduktion nach Applikation der therapeutischen Substanzen wurde mithilfe einer AnnexinV/PI-Färbung bzw. Annexin APC/PI-Färbung (durch FACS-Analysen) bestimmt. Annexin APC fand bei transduzierten Zellen Verwendung, da diese bereits durch die GFP-Markierung ein grünes Fluoreszenzsignal innehatten. Ein frühzeitiger Effekt der Apoptoseinduktion ist die Präsentation von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran, welche durch Annexin

detektiert wird. Propidiumiodid färbt dann, nachdem die Zellmembranintegrität in späteren Stadien der Apoptose gestört und so für PI permeabel wird und eine zusätzliche DNA-PI-Interkalierung gemessen werden kann [69].

In der Durchflusszytometrie ist es möglich, einzelne Zellen qualitativ und quantitativ zu analysieren. So kann jede einzelne Zelle durch eine Hochpräzisionsküvette innerhalb eines Trägermediums mit Laserdioden bestrahlt und das resultierende Streulicht über Photodetektoren dargestellt werden. Neben der Messung nach Markierung mit fluoreszenzmarkierten Proteinen bzw. Phospholipiden oder GFP-markierten Plasmiden, können Zellen so auch auf Größe und Granularität hin untersucht werden.

2.4. Expressionsanalysen

2.4.1. Molekulargenetische Expressionsanalyse

2.4.1.1. Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA)

Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des RNeasy Plus Mini Kits und wurde analog Herstellerprotokoll durchgeführt. Ein Zellpellet bestehend aus 1×10^7 -Zellen wurde nach Lyse mit RLT-Puffer über eine QIAshredder-Säule gegeben, die RNA-Extraktion erfolgte anschließend analog standardisiertem Protokoll. Die RNA-Konzentration sowie -Reinheit wurde anschließend mithilfe des Nanodrop 2000-Spektrophotometers gemessen.

2.4.1.2. cDNA-Synthese

Aus der gewonnenen RNA wurde im nächsten Schritt analog Herstellerprotokoll (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche) die cDNA synthetisiert. Unter strenger Einhaltung der Herstellervorgaben wurde jede Probe wie in Tabelle 6 zusammengesetzt, für eine Minute auf Eis abgekühlt und dann analog Tabelle 7 weiterverarbeitet. Die Einhaltung der entsprechenden Inkubationszeiten und -temperaturen wurde mithilfe eines Thermocyclers sichergestellt.

Tabelle 6: Schritt 1: Ansatz Template-Primer Mix

Reagenz	Volumen	Finale Menge
RNase freies Wasser	48 µl – x µl	
RNA	x µl	4 µg
Random Primer [3,2 µg/µl]	4 µl	12,8 µg
Inkubationsdauer [min]	10	
Temperatur [°C]	65	

Tabelle 7: Schritt 2: Ansatz Mastermix

Reagenz	Volumen	Finale Menge
RT Reaktionspuffer (5x)	16 µl	1x
RNase Inhibitor (40 U/µl)	2 µl	80 U
dNTPs (jeweils 10mM)	4 µl	je 40 nmol
RT (20 U/µl)	2 µl	40 U

Nach Zugabe des Mastermix ergibt sich ein Volumen von 76µl. Die für die cDNA-Herstellung verwendeten Temperaturen wurden wie in Tabelle 8 dargestellt im Thermocycler eingestellt. Die hergestellte DNA wurde nach Reaktionsabschluss, wenn nicht unmittelbar weiterverwendet, bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 8: Einstellungen Thermocycler zur cDNA-Synthese

	Dauer [min]	Temperatur [°C]
Anlagerung der Primer	10	25 °C
Synthese der cDNA	30	55 °C
Inaktivierung der RT	5	85 °C
Kühlung	∞	4 °C

2.4.1.3. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können gewünschte Gensequenzen in kleinster Menge in einem enzymabhängigen Reaktionsprozess gezielt amplifiziert werden. Anhand einer Einzelstrang-DNA gelingt nach Elongation durch Oligonukleotidprimer mithilfe einer hitzestabilen Taq-Polymerase die Synthese eines komplementären DNA-Stranges. Derartige Amplifikationszyklen können im Weiteren beliebig oft durchgeführt und die gewünschte DNA-Menge produziert werden [70].

In der Real-Time-PCR gelingt die direkte DNA-Quantifizierung durch Fluoreszenzmessung, welche in Echtzeit während der Probenmessung in der exponentiellen Phase der PCR stattfindet. Aus den diversen Detektionsmethoden wurde in dieser Arbeit das Verfahren mit TaqMan-Sonden angewandt [71]: Die angewendeten TaqMan-Sonden interagieren mit den synthetisierten DNA-Strängen, sodass das ermittelte Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des PCR-Produktes ansteigt. Mit fortlaufenden Reaktionszyklen steigt so das gewünschte amplifizierte Genprodukt und somit auch das Fluoreszenzsignal exponentiell an. Mit dem C_t -Wert wird der Zyklus beschrieben, ab dem das detektierte Fluoreszenzsignal erstmalig die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übersteigt.

Die iASPP-Expressionslevel wurden in einer relativen Quantifizierung bestimmt, um Wertverfälschungen aufgrund unterschiedlich eingesetzter cDNA-Mengen auszugleichen. Hierbei diente als Referenz zur Normierung der Messwerte die Bestimmung des Housekeeping-Gens GAPDH. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte analog Pfaffl et al. [72].

Die quantitative Realtime-PCR-Reaktion wurde im Light Cycler 480 (Roche) analog in Tabelle 9 aufgeführter Programmierung gemessen.

Tabelle 9: Light Cycler 480 Real-Time-PCR-Einstellungen

	Temperatur [°C]	Dauer	Temperaturanstieg [°C/s]
Pre-Inkubation	95	10 min	4,4
Amplifikation	95	10 min	4,4
	60	30 sec	2,2
	72	1 sec	4,4
Kühlung	40	30 sec	2,2
45 Amplifikationszyklen / Probe			

Die Messungen erfolgten in 96-Well-Platten. Für jede Probe wurde eine Triplet-Messung durchgeführt. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde eine Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser bei jeder Messung mitgeführt. Ein Reaktionsansatz pro Well setzt sich wie in Tabelle 10 aufgeführt zusammen.

Tabelle 10: Reaktionsansatz qRT-PCR

Reagenz	Volumen [μ l]
Wasser	1,8l
Forward Primer	1,5
Reverse Primer	1,5
Probe	0,2
LC 480 Master Mix	10
cDNA-Probe	5
Gesamtvolumen	20

Für die Messung am Lightcycler wurde die Light Cycler Software 480 (Version 1.5.1.62 SP3) verwendet.

Die Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgte mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode [73]. Essenziell für die Berechnung mithilfe dieser Methode ist, dass die PCR-Reaktionen für die zu untersuchenden Gene auf dem gleichen Effizienzniveau stattfinden. Im weiteren Schritt erfolgt die Subtraktion der C_t -Werte von Ziel- und

Referenzgen; somit ergibt sich ΔC_t . Um einen Gruppenvergleich zu erzielen, erfolgt eine erneute Subtraktion, nun der ΔC_t -Werte, wodurch man den $\Delta\Delta C_t$ -Wert erhält. Dieser wird zur Berechnung des Expressionsverhältnisses - dem FoldChange - in folgende Formel eingesetzt:

$$FoldChange = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Für alle weiterführenden Auswertungen wurden die Werte des FoldChange zur Berechnung mithilfe von statistischen Tests verwendet.

Für die Auswertung der qRT-PCR-Messwerte, wurde die iASPP-Expression in Patientenproben auf den Median der Expression von iASPP in mononukleären Zellen der gesunden Probandenkohorte normiert.

2.4.2. Proteinbiochemische Expressionsanalyse

2.4.2.1. Immunphänotypisierung

Die Untersuchung der Proteinexpression von iASPP erfolgte nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen (Fix and Perm Kit, An der Grub, Österreich) [60]. Für die Immunfärbung wurde ein monoklonaler iASPP-Antikörper (A4605, SIGMA Aldrich, USA) verwendet. Zur Visualisierung der Färbung, diente ein fluoreszierender Sekundärantikörper von Cell Signalling. Die Signalintensität je Zelle wurde mit dem Durchflusszytometer FACS Calibur detektiert.

Um die Blastenpopulation eindeutig zu identifizieren, erfolgte eine Immunfärbung mit CD34- und CD45-Antikörpern (BD Biosciences, USA); leukämische Blasten zeigen, da es sich um Nachfolger hämatopoetischer Progenitoren handelt, extrazellulär in der Regel eine hohe CD34-Expression, jedoch haben sie als typisches Charakteristikum eine nur geringe bzw. keine CD45-Expression [74].

Für die Färbung zur iASPP-Expressionsbestimmung wurden die zu untersuchenden Zellen in 500µl PBS suspendiert und 100µl Reagenz A zur Fixierung hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation wurde der Reaktionsansatz mit 5 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und nun 100µl Reagenz B zur Permeabilisierung sowie 10µl

iASPP-Primärantikörper (Abcam) hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation wurde der entsprechende fluoreszierende Sekundärantikörper (Cell Signaling) hinzugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert.

Für die Bestimmung der CD45- bzw. CD34-Expression wurden in einer Direktfärbung 15µl des jeweiligen Antikörperkonjugates appliziert und für 15 min inkubiert.

Es erfolgte ein letzter Waschschrift mit PBS und die Messung mittels Durchflusszytometer (FACSCalibur).

Die Messergebnisse der Durchflusszytometrie für die Proteinexpressionen wurden unter Verwendung des gemessenen Geometrischen Mittelwertes, dem sog. GeoMean, ausgewertet. Als Referenz einer Probe diente die Färbung gegen das IgG derselben.

2.5. iASPP-silencing mittels lentiviraler genetischer Modifikation

2.5.1. Expressionssuppression mithilfe von short hairpin-RNA

2.5.1.1. Versuchsprinzip

Zur Untersuchung der Funktion von iASPP war von Interesse festzustellen, welche Unterschiede sich bei Expressionssuppression in einer Zelle mit hoher iASPP-Expression zeigen. Die spezifische Suppression der iASPP-Transkription wurde mithilfe eines shRNA-Verfahrens mit lentiviralem Vektor durchgeführt. Für diese Experimente wurde das kommerziell verfügbare GIPZ-Lentiviral-shRNAmir-System von GE Dharmacon genutzt. Der iASPP-shRNA-Vektor wurde aus einer Plasmidpräparation eines kommerziell erwerblichen Glycerolstocks Escherichia-coli-Bakterien gewonnen. Als Kontrolle für alle im weiteren Verlauf durchgeführten Experimente diente ein leerer Kontrollvektor. Im Folgenden sind die einzelnen Versuchsschritte, welche zur Herstellung des lentiviralen Vektors durchlaufen wurden, näher erläutert.

2.5.1.2. Plasmidpräparation

Im ersten Schritt wurde die Vermehrung des erworbenen E. coli-Stammes zur Plasmidamplifikation vorgenommen. Hierfür, wurden 10µl der E. coli-Suspension in 25 ml ampicillinhaltigem LB-Medium kultiviert. Ziel der Ampicillinkonzentration von 100µg/ml war es, eine unerwünschte Kontamination zu vermeiden und die shRNA-Konstrukt-tragenden und somit ampicillinresistenten Bakterien zu selektionieren. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Im nächsten Schritt wurde die Plasmid-DNA mithilfe des PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit analog Herstellerprotokoll isoliert. Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des Nanodrops 2000 Spektrophotometers bestimmt sowie die Reinheit der Probe kontrolliert ($1,8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2,0$).

2.5.1.3. Herstellung lentiviraler Vektoren (Transfektion)

Die Herstellung der lentiviralen Vektoren wurde in HEK293T-Zellen durch einbringen des gewonnenen shRNA-Vektor-Plasmids vorgenommen. Hierfür fand das Trans-Lentiviral Packaging Kit (GE Dharmacon) Verwendung. Die Zellen wurden in einer 6-Well-Platte kultiviert. Bei Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurde 1ml pures DMEM und 300µl Transfektionsreagenz (Tabelle 11) hinzugegeben und für 6 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde jeweils 1ml DMEM-Vollmedium in jedes Well hinzugefügt und der Transfektionsansatz für weitere 10 Stunden Inkubiert.

Tabelle 11: Transfektionsreagenz

Reagenz	Volumen
Plasmid-Verdünnung (6 µg DNA)	130,7 µl
Trans-Lentiviral Packaging Mix	4,3 µl
CaCl ₂	15 µl
2x HBSS Reagenz	150 µl
Gesamtvolumen	300 µl

Als Nächstes wurde das mit Transfektionsreagenz versetzte Medium durch 2 ml DMEM-Nährmedium mit reduziertem FBS-Anteil von 5% ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 48 Stunden inkubiert. Die in dieser Zeit in das umgebende Medium abgegebenen Viruspartikel wurden nach Zentrifugation aus dem Überstand gewonnen und bei -80°C asserviert. Als Transfektionskontrolle konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie das Vorhandensein des Fluoreszenz-Reporter-Moleküls TurboGFP optisch dargestellt werden.

2.5.1.4. Lentivirale Transduktion der Zielzellen

Die Suppression der iASPP-Transkription wurde in den Zelllinien Jurkat und Molm14 vorgenommen. Hierfür wurden die Zellen analog der Transfektion für 6 Stunden in 1 ml purem Nährmedium sowie 200µl der Viruspartikelsuspension in einer 6-Well-Platte inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 1 ml voll angesetztem Nährmedium wurden die Zellen für 48 Stunden inkubiert. Die Effizienz der Transduktion konnte optisch mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Im weiteren Verlauf erfolgte die Selektion der transduzierten Zellen durch Zugabe von Puromycin bei durch den eingeführten Vektor vermittelter Puromycinresistenz.

Zum Abschluss, wurde die tatsächliche Suppression der iASPP-Expression mittel qRT-PCR bestimmt.

2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Gunnar Blumenstock aus dem Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen vorgenommen. Darüber hinaus fand die Software GraphPad Prism® Anwendung. Als statistische Tests wurden der t-Test für normalverteilte Datensätze und der Mann-Whitney-U-Test bei Daten ohne Normalverteilung genutzt. Korrelationen zwischen klinischen Charakteristika und der iASPP - Expression wurden unter Annahme nicht normalverteilter Datensätze mittels Spearman-Rang-Korrelation auf Signifikanz geprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von iASPP in Blasten von AML-Patienten und leukämischen Zelllinien

3.1.1. Patientenkohorte

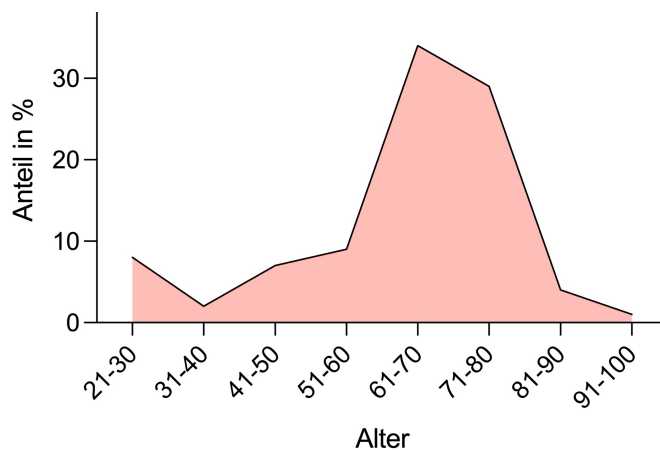
Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Datenerhebung 99 Patientenproben analysiert. Ihnen gegenüber steht eine Kontrollkohorte, welche aus der Untersuchung von Knochenmark gesunder Donoren besteht; hiervon wurden insgesamt 31 Proben analysiert.

3.1.1.1. Patientenkohorte charakterisiert nach Alter und Geschlecht

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv umfasste insgesamt 99 Patienten und bestand aus 44 (46,8%) Frauen und 50 (53,2%) Männern. Von fünf Patienten lagen die klinischen Daten nicht vor. Zum Diagnosezeitpunkt und anhand der vorliegenden klinischen Daten war der jüngste Patient 21 Jahre alt, der Älteste hatte ein Alter von 91 Jahren. Das durchschnittliche Patientenalter lag bei 63,2 Jahren, der Median bei 67,5 Jahren. Die Altersklassenverteilung ist in Abbildung 4 dargestellt. Patienten, die mangels klinischer Daten nicht ausgewertet werden konnten, sind unter n.b. (=nicht bekannt) aufgeführt.

Die Patientenkohorte wurde zudem nach Erstdiagnose bzw. AML-Rezidiv unterteilt. Die deskriptive Statistik der Altersklassenverteilung für die Messmethoden Immunphänotypisierung und qRT-PCR nach dieser Subgruppierung ist unter Tabelle 12 zusammengefasst. Abbildung 5 zeigt eine grafische Gegenüberstellung der Altersklassenverteilung beider Subgruppen.

Abbildung 4: Altersklassenverteilung im Patientenkollektiv

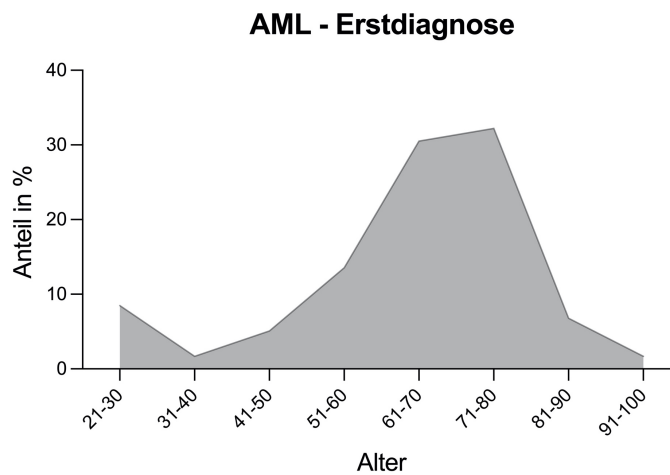


Alter	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	n.b.
Anteil in %	8.1	2.0	7.1	9.1	34.3	29.3	4.0	1.0	5.1

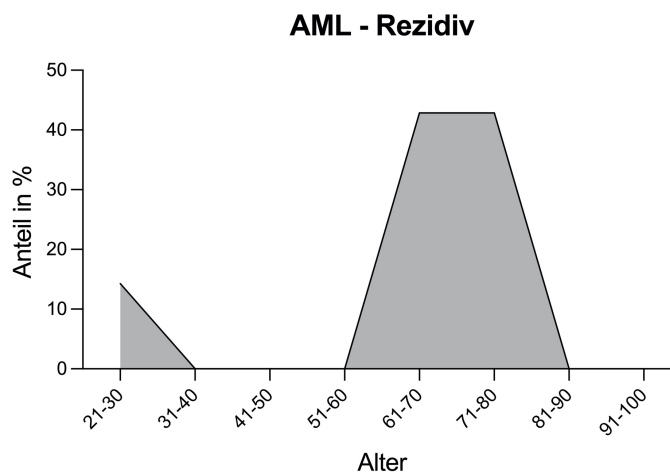
Tabelle 12: Deskriptive Statistik der Altersklassenverteilung bei AML-Erstdiagnose sowie AML-Rezidiv

	Erstdiagnose	Rezidiv
Patientenzahl	81	13
Minimum	21	27
Maximum	91	74
Altersdurchschnitt	63,14	63,53
SD	15,17	11,47
n.b. =5		

Abbildung 5: Altersklassenverteilung bei Erstdiagnose bzw. AML-Rezidiv in Gegenüberstellung



Alter	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
Erstdiagnose	8.5	1.7	5.1	13.6	30.5	32.2	6.8	1.7



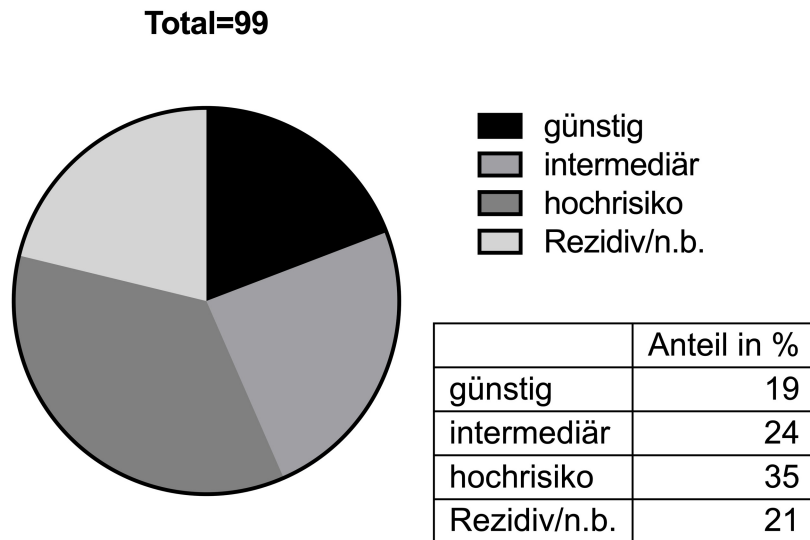
Alter	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
Rezidiv	14.3	0.0	0.0	0.0	42.9	42.9	0.0	0.0

3.1.1.2. Patientenkohorte analog ELN-Risikostratifizierung

Die Risikostratifizierung bei der AML spielt bei der Wahl der Therapie eine essenzielle Rolle. Abbildung 6 zeigt die Verteilung der drei Risikogruppen in der untersuchten Patientenkohorte, wie sie durch das European LeukemiaNet ELN

formuliert worden sind und unter 1.1.4. ausführlich zuvor dargestellt wurden (Döhner et al., 2017 [10]). Die Patienten, die diesbezüglich nicht bewertet werden konnten, wurden mit der Beschriftung n.b. (=nicht bekannt) ausgewiesen.

Abbildung 6: Anteilige Darstellung der Risikoklassen innerhalb des gesamten Patientenkollektivs zum Zeitpunkt der Erstdiagnose analog ELN



Neben der ELN-Risikobestimmung und dem Alter, spielen bei der AML weitere Laborparameter eine essenzielle Rolle, so beispielsweise die Leukozytenzahl im Blut, der Anteil blastärer Zellen sowie die Laktatdehydrogenase.

Tabelle 13 und Tabelle 14 demonstrieren eine Zusammenfassung der Daten der untersuchten Patienten. In Tabelle 13 sind zudem Patienten ausgewiesen, bei denen ein Rezidiv (Beschriftung in Tabelle: **Rezidiv**) oder eine sekundäre Leukämie (Beschriftung in Tabelle: **sek. AML**) diagnostiziert worden ist. Bei Patienten ohne weitere Angaben handelte es sich um eine *de novo* AML. Patienten mit unbekanntem klinischen Daten wurden mit einem Stern (*) markiert.

Tabelle 13: Klinische Parameter der in die Patientenkohorte eingeschlossenen Probanden

Proband	Alter	Geschlecht	ELN-Klassifikation
P1	73	männlich	intermediär
P2	59	weiblich	günstig
P3	49	männlich	hochrisiko
P4*			
P5*			
P6	40	männlich	hochrisiko
P7	21	weiblich	hochrisiko
P8 - sek. AML, Rezidiv	41	weiblich	intermediär
P9 - sek. AML	69	weiblich	hochrisiko
P10	55	weiblich	intermediär
P11	25	männlich	günstig
P12	30	männlich	intermediär
P13	56	männlich	günstig
P14 - sek. AML	78	weiblich	intermediär
P15	71	weiblich	günstig
P16	69	weiblich	intermediär
P17	71	weiblich	günstig
P18	77	männlich	n.b.
P19 - Rezidiv	26	männlich	intermediär
P20	70	männlich	günstig
P21 - sek. AML	52	weiblich	günstig
P22 - sek. AML, Rezidiv	70	weiblich	günstig
P23	62	männlich	intermediär
P24	50	weiblich	intermediär
P25	61	weiblich	günstig
P26 - sek. AML	73	weiblich	intermediär
P27	71	weiblich	hochrisiko
P28	70	weiblich	hochrisiko
P29*			
P30	81	männlich	n.b.
P31	74	männlich	hochrisiko
P32	78	männlich	hochrisiko

Proband	Alter	Geschlecht	ELN-Klassifikation
P33	89	männlich	hochrisiko
P34	80	männlich	hochrisiko
P35 - sek. AML	74	männlich	hochrisiko
P36	79	männlich	hochrisiko
P37 - sek. AML	73	männlich	hochrisiko
P38	58	männlich	hochrisiko
P39	77	weiblich	günstig
P40 - sek. AML	58	weiblich	intermediär
P41	70	weiblich	intermediär
P42	58	weiblich	intermediär
P43 - sek. AML, Rezidiv	67	männlich	günstig
P44 - sek. AML, Rezidiv	27	männlich	intermediär
P45	83	männlich	intermediär
P46	83	weiblich	intermediär
P47	55	männlich	günstig
P48	67	weiblich	hochrisiko
P49	75	weiblich	günstig
P50 - sek. AML	49	männlich	intermediär
P51	54	männlich	intermediär
P52	50	männlich	intermediär
P53 - sek. AML	70	männlich	hochrisiko
P54 - sek. AML	70	weiblich	hochrisiko
P55 - sek. AML	75	männlich	hochrisiko
P56	74	weiblich	hochrisiko
P57	63	weiblich	günstig
P58	91	weiblich	n.b.
P59	75	männlich	hochrisiko
P60 - sek. AML	71	männlich	hochrisiko
P61	63	weiblich	günstig
P62 - sek. AML, Rezidiv	63	weiblich	hochrisiko
P63 - sek. AML	55	männlich	hochrisiko
P64	64	weiblich	intermediär
P65 - sek. AML	66	männlich	hochrisiko
P66 - sek. AML	64	männlich	hochrisiko

Proband	Alter	Geschlecht	ELN-Klassifikation
P67 - Rezidiv	61	weiblich	günstig
P68 - sek. AML	61	weiblich	günstig
P69 - sek. AML, Rezidiv	64	männlich	intermediär
P70	64	männlich	günstig
P71	62	männlich	intermediär
P72 - sek. AML	65	weiblich	hochrisiko
P73	72	weiblich	hochrisiko
P74 - Rezidiv	62	weiblich	intermediär
P75	35	weiblich	intermediär
P76	28	weiblich	hochrisiko
P77	62	männlich	intermediär
P78	76	männlich	hochrisiko
P79 - sek. AML	46	weiblich	günstig
P80 - sek. AML	76	männlich	intermediär
P81 - Rezidiv	68	männlich	intermediär
P82	77	männlich	hochrisiko
P83	68	männlich	hochrisiko
P84 - Rezidiv	61	männlich	hochrisiko
P85	49	weiblich	günstig
P86	67	weiblich	intermediär
P87 - sek. AML, Rezidiv	73	weiblich	günstig
P88 - sek. AML	65	männlich	günstig
P89	70	weiblich	intermediär
P90	70	weiblich	intermediär
P91 - sek. AML	69	männlich	hochrisiko
P92	29	männlich	hochrisiko
P93	73	männlich	hochrisiko
P94*			
P95	27	weiblich	günstig
P96	73	männlich	hochrisiko
P97	72	männlich	hochrisiko
P98 - Rezidiv	74	männlich	günstig
P99*			

* Klinische Daten nicht bekannt.

Tabelle 14: Relevante Laborparameter der analysierten Patienten

Proband	LDH [U/l]	% Blasten im Blut	% Blasten im Knochenmark	WBC [/ μ l]
P1	277	39	82,5	10650
P2	4064	47	44	129500
P3	462	0,83	65	29150
P4*				
P5*				
P6	1014	1	74,5	81250
P7	1465	95	91,5	83950
P8	502	55	5	2530
P9	278	12	66	750
P10	303	87	71	3940
P11	771	16	24,5	27000
P12	1071	53	51	24500
P13	330	40	70	8800
P14	827	0,2	70	45800
P15	386	12	20	17600
P16	2517	84	n.b.	165000
P17	288	76	95	8520
P18	1098	46	n.b.	17770
P19	237	6	49	1320
P20	564	50	50	73560
P21	185	5	25	2450
P22	303	7	40	4530
P23	382	68	89	22200
P24	321	60	60	11340
P25	214	88	n.b.	5460
P26	498	20	84	53800
P27	277	4	63	3920
P28	304	3	63	4570
P29*				
P30	1460	4	n.b.	141890
P31	5960	45	n.b.	103200
P32	434	30	61,5	5930
P33	459	60	n.b.	103200
P34	1189	84	85	85000
P35	1855	36	n.b.	11580
P36	455	70	80	38000
P37	248	15	50	14000
P38	942	80	60	87940
P39	209	3	74,5	1490
P40	1180	92	56,5	62000

Proband	LDH [U/l]	% Blasten im Blut	% Blasten im Knochenmark	WBC [/ μ l]
P41	1832	47	n.b.	3500
P42	1180	92	56,5	62000
P43	5507	2	21	58900
P44	200	13	15	4110
P45	208	63	80	2100
P46	627	88	88	181000
P47	205	46	85	920
P48	289	0	12,5	15110
P49	909	22	37	42700
P50	838	84	77,5	149660
P51	2031	32	n.b.	13090
P52	1223	85	88,5	105590
P53	1067	39	55	11030
P54	311	13	40	2680
P55	236	10	61	3940
P56	393	77	n.b.	26040
P57	214	0	57	1300
P58	383	21	31	23440
P59	461	76	n.b.	14990
P60	281	12	16	3200
P61	561	44	44	87140
P62	512	56	30	23300
P63	470	78	80	61500
P64	699	45	60	8000
P65	1162	85	80	31080
P66	236	13	40	3620
P67	119	40	n.b.	1900
P68	380	61	62	6080
P69	510	69	50	6560
P70	782	51	50	74440
P71	309	30	66	8100
P72	203	71	73,5	14050
P73	1586	65	40	7560
P74	431	30	n.b.	920000
P75	692	76	n.b.	8080
P76	377	93	90	180830
P77	761	47	40	16200
P78	561	71	n.b.	104700
P79	978	65	n.b.	169280
P80	1387	65	90	129310
P81	772	20	20	39250
P82	319	60	73,5	4000
P83	237	87	86	122450

Proband	LDH [U/l]	% Blasten im Blut	% Blasten im Knochenmark	WBC [μ l]
P84	933	81	74	14300
P85	391	92	69	27250
P86	653	65	52	69900
P87	2253	90	0	187000
P88	423	99	67,5	44250
P89	449	87	70	56000
P90	2108	56	10	82860
P91	1171	87	n.b.	3000
P92	329	83	n.b.	49940
P93	324	70	30	33000
P94	2081	91	n.b.	384730
P95*				
P96	609	20	92	50650
P97	359	32	77	1400
P98	220	10	28,5	1610
P99	801	88	n.b.	23360

* Klinische Daten nicht bekannt.

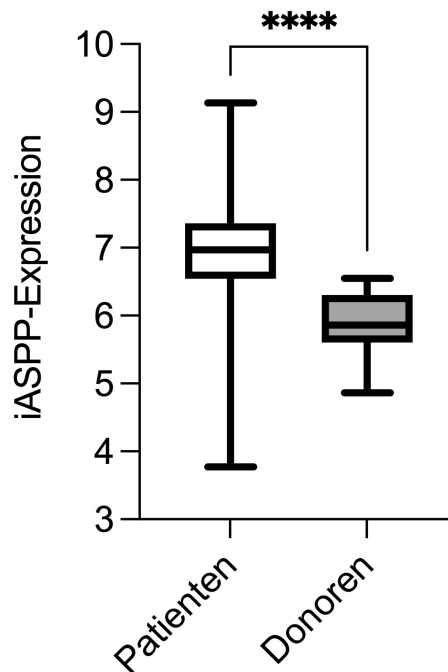
3.1.2. iASPP Expression in akuter myeloischer Leukämie

3.1.2.1. Durchflusszytometrische Expressionsbestimmung

In dieser Arbeit wurde die iASPP-Expression in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie untersucht. Hierfür wurde mittels Immunphänotypisierung (siehe Abschnitt 2.4.2.) die iASPP-Expression in 73 Patienten mit Erstdiagnose einer AML bzw. eines AML-Rezidivs bestimmt. Als statistische Referenz diente die Bestimmung der iASPP-Expression in mononukleären Zellen von 31 gesunden Knochenmarkspendern.

Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte mittlere iASPP-Expression in der Patientenkohorte im Vergleich zu den gesunden Probanden (Abbildung 7), bei allerdings hoher Streuung.

Abbildung 7: iASPP-Expression ist in AML-Blasten signifikant erhöht

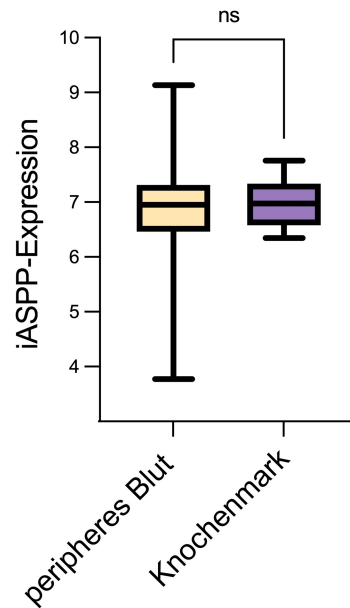


Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests. ****
 $p \leq 0,0001$. $n = 73$.

Die Expression von iASPP in Blasten aus Blut oder Knochenmark zeigte innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs keinen Unterschied (Abbildung 8). Die statistische Berechnung ergab nahezu identische Mittelwerte für die iASPP-Expression in Blut und Knochenmark (1260 bzw. 1179). Auch die Auswertung der iASPP-Expression mit Unterscheidung zwischen Blasten aus Blut- und Knochenmarkproben zeigte verglichen mit der gesunden Kohorte ein signifikantes Ergebnis (Abbildung 9).

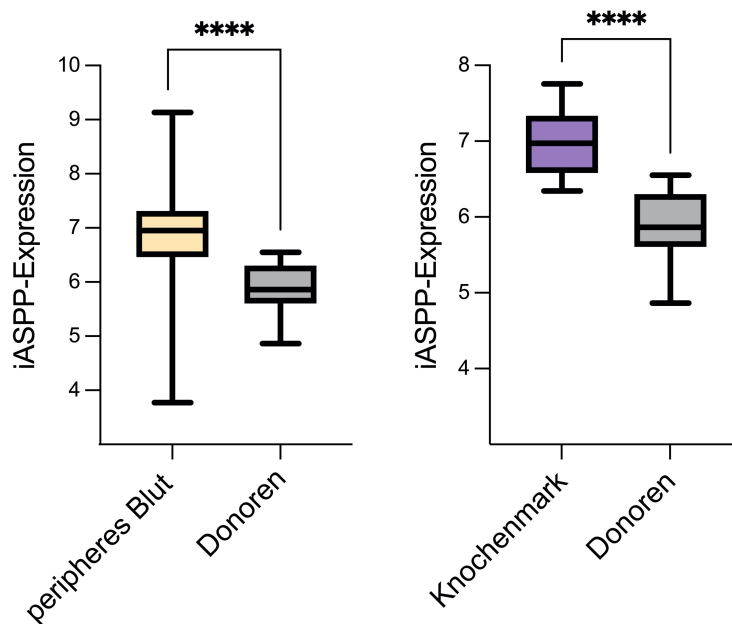
Die vorgenommenen statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung der Statistiksoftware GraphPad Prism durchgeführt.

Abbildung 8: Mittelwert der iASPP-Expression in AML-Blasten von Patienten unterscheidet sich in Blut und Knochenmark nicht signifikant



Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests. ns = nicht signifikant. Die iASPP-Expression wurde in 26 Knochenmarkproben und 55 Blutproben bestimmt.

Abbildung 9: Vergleich der iASPP-Expression leukämischer Blasten aus Blut und Knochenmark mit Donoren



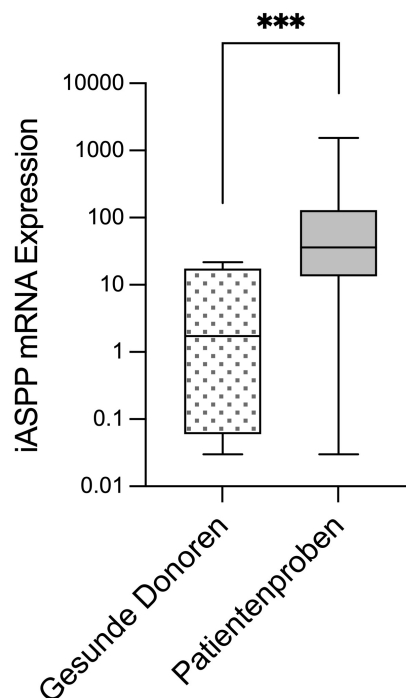
Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests. **** $p \leq 0,0001$. Die iASPP-Expression wurde in 26 Knochenmarkproben und 55 Blutproben bestimmt.

3.1.2.2. iASPP-Expressionsbestimmung mittels qRT-PCR

Die in der Immunphänotypisierung erhobenen Expressionsdaten wurden mithilfe der quantitativen RT-PCR verifiziert (s. Abschnitt 2.4.1.). Hierbei wurde verfügbares Material von 43 Patienten und 11 gesunden Donoren in die Analyse einbezogen.

Die Messwerte der gesunden Kohorte wurden dabei auf den Mittelwert der iASPP-Expression aller gesunden Donoren normiert. Die iASPP-Expression in Patientenblasten wurde ebenso bezogen auf den ermittelten Mittelwert der iASPP-Expression der gesunden Kohorte analysiert. Abbildung 10 veranschaulicht die Auswertung der qRT-PCR-Messungen. Das in der Immunphänotypisierung dargestellte Ergebnis konnte somit in der qRT-PCR nachvollzogen werden.

Abbildung 10: Mittelwert der iASPP-mRNA-Expression in AML-Blasten von Patienten signifikant erhöht

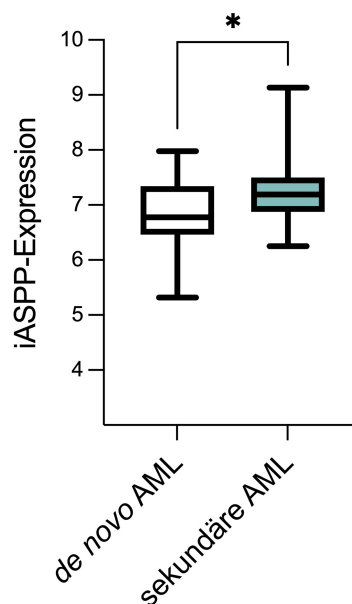


Es wurden 43 Patientenproben untersucht. Ihnen gegenüber stehen die mRNA-iASPP-Expressionswerte von 11 gesunden Donoren. Der mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelte p-Wert lag bei 0,0001.

3.1.2.3. Expressionsanalyse unter Berücksichtigung von Diagnose und Therapieansprechen

Zunächst wurde die Patientenkohorte hinsichtlich der AML-Diagnose näher betrachtet. Dabei wurde berücksichtigt, ob eine *de novo* AML oder eine sekundäre AML vorlag (Abbildung 11). Hier konnte in der Durchflusszytometrie festgestellt werden, dass bei Patienten mit sekundärer AML die iASPP-Expression signifikant höher ist.

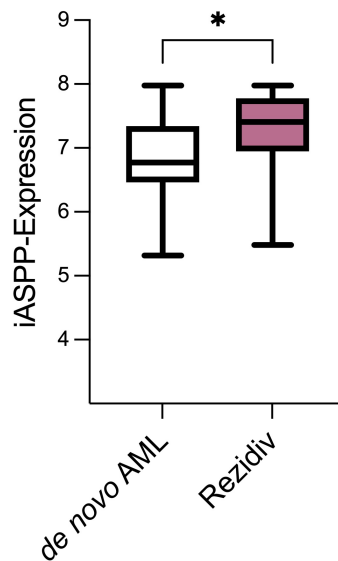
Abbildung 11: iASPP-Expression in sekundärer AML signifikant höher als in *de novo* AML



Für die statistischen Berechnungen wurden 42 Patienten mit *de novo* AML und 24 Patienten mit sekundärer AML ausgewertet. Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0149.

Ferner, wurde zwischen einer *de novo* AML und einem AML-Rezidiv unterschieden. Auch hier konnte ein statistisch signifikantes Ergebnis beobachtet werden, wobei Rezidiv-Patienten eine höhere iASPP-Expression aufwiesen (Abbildung 12).

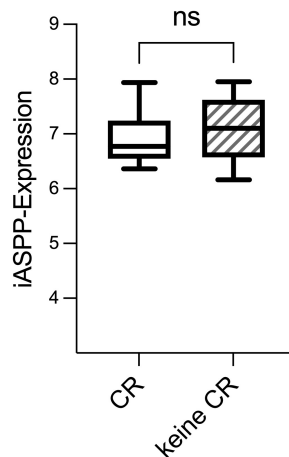
Abbildung 12: AML-Rezidive zeigen eine signifikant höhere iASPP-Expression als *de novo* AML



Für die statistischen Berechnungen wurden 10 Patienten mit Rezidiv und 42 Patienten mit *de novo* AML ausgewertet. Die statistischen Berechnungen unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests ergaben ein signifikantes Resultat mit einem p-Wert von 0,0450.

Im Hinblick auf die Frage, ob iASPP potenziell als früher Marker bzw. Indikator für ein Therapieansprechen herangezogen werden könnte, wurde die durchflusszytometrisch bestimmte iASPP-Expression in den Patienten dem späteren Remissionsstatus nach dem ersten Zyklus der Induktionstherapie gegenübergestellt. Die Auswertung der 32 Patienten ergab hier keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 13).

Abbildung 13: Vergleich iASPP-Expression und Therapieansprechen



Für die Analyse standen 17 Patienten mit bestätigter CR zur Verfügung. Ihnen gegenüber standen 15 Patienten, die nach dem ersten Zyklus der Induktionstherapie keine CR aufwiesen. Der mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelte p-Wert lag bei 0,39.

3.1.2.4. Korrelation von iASPP-Expression und klinischen Daten

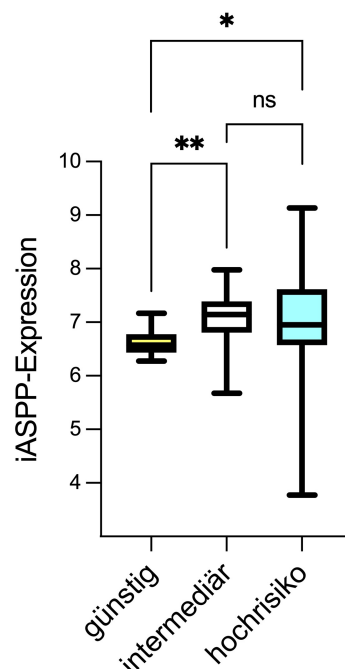
Im nächsten Schritt wurde der in der Durchflusszytometrie erhobene Datensatz unter Berücksichtigung klinischer Charakteristika analysiert. Die Patientenkohorte und die erhobenen iASPP-Expressionen wurden nach klinischen Phänotypen in Subgruppen unterteilt, um zu untersuchen, ob sich im Rahmen einer solchen Betrachtung signifikante Unterschiede oder Korrelationen in der Expression zeigen und somit eine Subgruppenbetrachtung zur Identifizierung einer Subkohorte mit erhöhtem Risikoprofil führen könnte.

Als gemeinsames Merkmal einer Subgruppe wurden sowohl AML-typische als auch klinische Phänotypen gewählt. Dabei wurden zum einen molekulargenetische Aspekte berücksichtigt und eine Subgruppierung der Patientenkohorte nach ELN-Klassifikation vorgenommen (Abbildung 14). Ferner, wurden laborchemische Charakteristika, welche mit einem erhöhten Risikoprofil einhergehen, gewählt; hierunter fallen die Leukozytenzahl, der Blastenanteil sowie die Laktatdehydrogenase [1]. Beim Blastenanteil wurde außerdem zwischen Blastenanteil im Blut sowie im Knochenmark, sofern entsprechende Untersuchungen im Prozess der Diagnosesicherung durchgeführt wurden und Werte vorlagen, unterschieden. Zudem wurde untersucht, ob eine

Subgruppierung unter Berücksichtigung vom Alter gelingen kann. Für die Auswertung der Korrelationen wurde die statistische Software GraphPad Prism verwendet.

Ein Zusammenhang zwischen der iASPP-Expression bei *de novo* AML und dem Risikoprofil konnte mit statistischer Signifikanz festgehalten werden (Abbildung 14): Zwischen Patienten mit günstigem und intermediärem bzw. Hochrisikoprofil konnte ein signifikanter iASPP-Expressionsunterschied mit höheren Expressionswerten in der Subgruppe mit intermediärem und ungünstigem Risikoprofil beobachtet werden. Für den Vergleich zwischen intermediärem und ungünstigem Risikoprofil ergab die statistische Berechnung aufgrund der Streuung kein signifikantes Ergebnis.

Abbildung 14: Niedrigere iASPP-Expression bei AML-Patienten mit günstigem Risikoprofil



15 Patienten mit günstigem, 19 Patienten mit intermediärem und 23 Patienten mit ungünstigem Risikoprofil analog ELN-Klassifikation wurden ausgewertet. Für die statistischen Berechnungen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Der p-Wert lag für den Vergleich zwischen intermediärem und Hochrisikoprofil bei 0,6346. Der Vergleich der Kohorte mit günstigem bzw. intermediärem Risikoprofil zeigte ein signifikantes Ergebnis mit einem p-Wert von 0,0064 (**), genauso der Vergleich der Kohorten mit günstigem bzw. ungünstigem Risikoprofil mit einem p-Wert von 0,0478 (*).

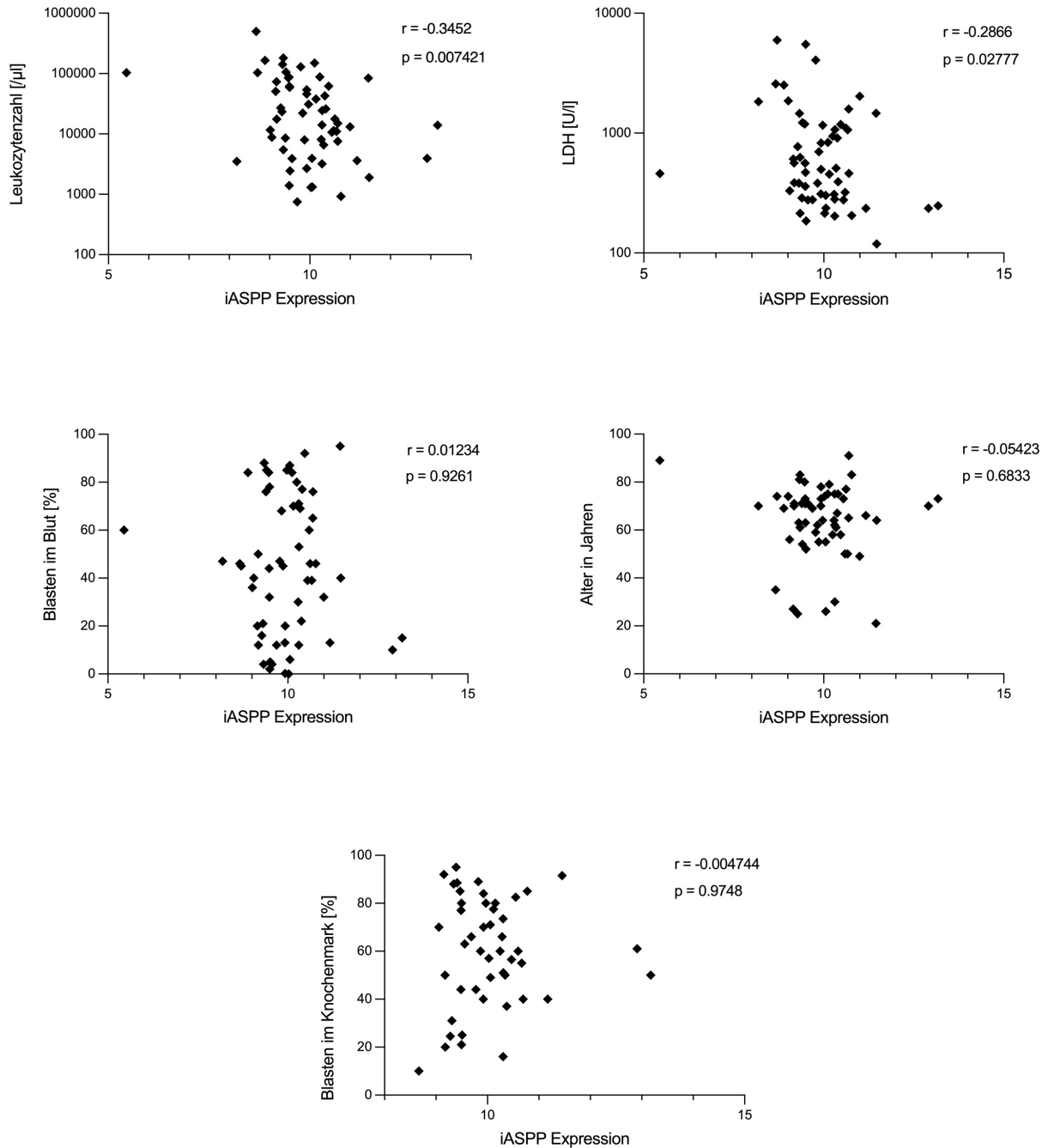
Bezüglich der laborchemischen Subgruppierung wurden die statistischen Berechnungen für *de novo* und sekundärer AML jenen für AML-Rezidive gegenübergestellt. Für die statistische Auswertung der Korrelation wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r angewendet.

Abbildung 15 stellt die Analysen für Patienten mit AML-Erstdiagnose dar, Abbildung 16 jene für die Patienten mit AML-Rezidiv.

Für die Patienten mit AML-Erstdiagnose zeigte sich, dass die iASPP-Expression invers mit der Leukozytenzahl im peripheren Blut ($r = -0,3452$, $p = 0,0074$) sowie der Laktatdehydrogenase ($r = -0,2866$, $p = 0,0278$) korreliert. Mit steigender iASPP-Expression lag somit eine geringere Leukozytenzahl und ein kleinerer Laborwert für die Laktatdehydrogenase vor. Für beide Parameter waren die statistischen Korrelationsberechnungen signifikant. Für Alter sowie den Blastenanteil im peripheren Blut bzw. im Knochenmark konnte kein relevanter Zusammenhang in dieser Subgruppierung beobachtet werden.

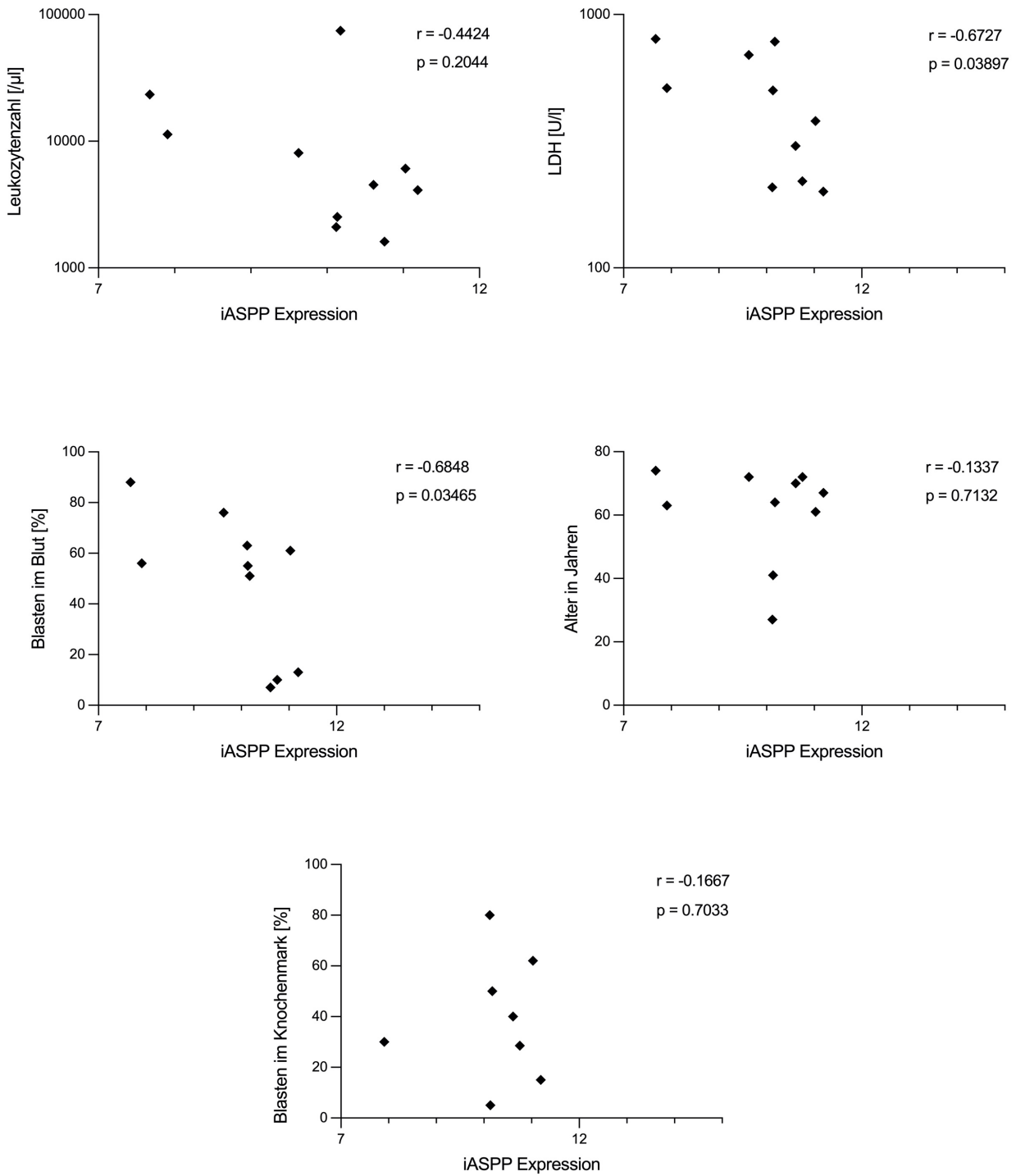
Bei der Unterscheidung innerhalb der AML-Erstdiagnosen zwischen *de novo* und sekundärer AML konnte in statistischen Berechnungen für keinen der ausgewerteten Laborparameter ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Abbildung 15: iASPP-Expression korreliert invers mit der Leukozytenzahl im Blut und der Laktatdehydrogenase bei AML-Erstdiagnose



Die einzelnen Rauten stellen jeweils einen Patienten dar. Auf der x-Achse ist die iASPP-Expression aufgetragen, auf der y-Achse das jeweilige klinische Merkmal, dessen Zusammenhang mit der iASPP-Expression untersucht wurde. Zu jeder statistischen Analyse ist der jeweilige Spearman-Rangkorrelationskoeffizient r bzw. p -Wert in der Grafik angegeben.

Abbildung 16: iASPP-Expression korreliert invers mit der Laktatdehydrogenase sowie dem Blastenanteil im peripheren Blut beim AML-Rezidiv



Die Darstellung dieser Auswertung erfolgte analog Beschreibung unter Abbildung 15.

Bei der Auswertung der klinischen Parameter bei AML-Rezidiven zeigte sich ebenfalls eine inverse Korrelation der iASPP-Expression mit der Laktatdehydrogenase ($r = -0,6727$, $p = 0,03897$), ebenso mit dem Blastenanteil im peripheren Blut ($r = -0,6848$, $p = 0,03465$). Dies bedeutet, dass mit zunehmender iASPP-Expression ein geringerer Blastenanteil im Blut bzw. eine geringerer Laktatdehydrogenasewert zu beobachten war. Für Leukozytenzahl, Alter sowie Blastenanteil im peripheren Blut war kein signifikanter Zusammenhang bei den AML-Rezidiven festzustellen.

Tabelle 15 und Tabelle 16 fassen die deskriptive Statistik der in Abbildung 15 und Abbildung 16 ausgewerteten Patientenkohorten zusammen.

Tabelle 15: Deskriptive Statistik der in Abbildung 15 ausgewerteten Patienten mit *de novo* und sekundärer AML

	Leukozytenzahl (/µl)	LDH (U/l)	Blasten im Blut (%)	Alter (Jahre)	Blasten im Knochenmark (%)
n	59	59	59	59	47
Median	47223	949	46	64	60
Maximum	498000	5960	95	70	85
Minimum	750	119	0	21	10
95%-CI	27520 – 66926	647 - 1252	38 - 53	60 - 68	53 - 66

Tabelle 16: Deskriptive Statistik der in Abbildung 16 ausgewerteten Patienten mit AML-Rezidiv

	Leukozytenzahl (/µl)	LDH (U/l)	Blasten im Blut (%)	Alter (Jahre)	Blasten im Knochenmark (%)
n	10	10	10	10	8
Median	5305	441	56	66	35
Maximum	74440	801	88	74	80
Minimum	1610	200	7	27	5
95%-CI	2104 - 29742	628	68	72	59

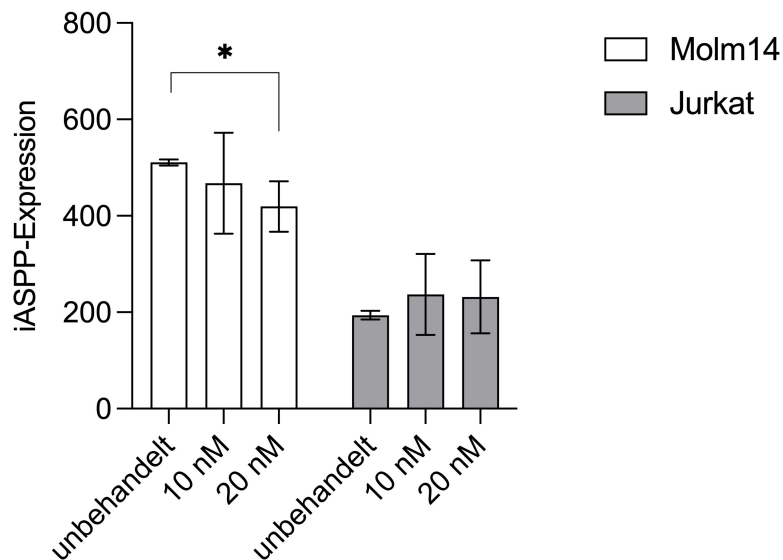
3.1.2.5. Abfall der iASPP-Expression in der AML-Zelllinie Molm14 unter Applikation chemotherapeutischer Substanzen

Nachdem in der untersuchten Patientenkohorte eine signifikant höhere iASPP-Expression im Vergleich zu den gesunden Donoren zu beobachten war, wurde im nächsten Schritt das Expressionsmuster unter Applikation einer Induktionschemotherapie in Anlehnung an die Arbeit der Arbeitsgruppe von Kampa-Schittenhelm et al. [65] betrachtet. Schittenhelm et al. konnten hier zeigen, dass eine verminderte ASPP2-Expression mit einer reduzierten Apoptoseinduktion in nativen Blasten unter Induktionschemotherapie einhergeht [65]. Als antiapoptotisches Mitglied der Proteinfamilie der Apoptosestimulierenden Proteine, ergibt sich somit für iASPP die Arbeitshypothese, dass ein erhöhter Proteinexpressionslevel mit einer reduzierten Apoptoseinduktion unter Chemotherapie und folglich einem schlechteren Therapieansprechen assoziiert ist.

In unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass die ASPP2-Expression in leukämischen Zelllinien nach Behandlung mit Daunorubicin steigt [65]. In Analogie zu diesem Experiment, wurde die gleiche Fragestellung im Bezug auf iASPP untersucht.

Es wurde Daunorubicin mit einer Behandlungskonzentration von 10nM und 20nM als chemotherapeutische Substanz eingesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die in Abbildung 17 dargestellten Expressionsverläufe durchflusszytometrisch bestimmt: Für die Molm14-Zelllinie zeigte sich mit steigender Behandlungskonzentration eine Abnahme der iASPP-Expression, während der Expressionsunterschied bei der Jurkat-Zelllinie geringfügig war.

Abbildung 17: iASPP-Expression sinkt unter Behandlung mit Daunorubicin in der AML-Zelllinie Molm14



Die untersuchten Zelllinien wurden mit der chemotherapeutischen Substanz Daunorubicin für eine Dauer von 24 Stunden inkubiert. Dargestellt ist die durchflusszytometrisch bestimmte iASPP-Expression nach der Behandlung in Gegenüberstellung zu der jeweils unbehandelten Probe. Für die Molm14 zeigte sich zwischen den unbehandelten Zellen und jenen mit 20nM behandelten ein signifikanter Unterschied ($p=0,0402$).

3.1.2.6. Untersuchung der iASPP-Expression in Patienten nach Beginn der Induktionstherapie

Nach Messung der initialen iASPP-Expression bei Diagnosestellung, wurde das Expressionsmuster im Therapieverlauf bestimmt. In Abbildung 18 sind die mittels Durchflusszytometrie bestimmten Expressionsverläufe unter Berücksichtigung des Remissionsstatus nach dem ersten Zyklus Induktionschemotherapie aufgeführt. Abbildung 19 demonstriert die Messerwerte aus der qRT-PCR.

Abbildung 18: iASPP-Expression im Therapieverlauf unter Berücksichtigung des späteren Remissionsstatus

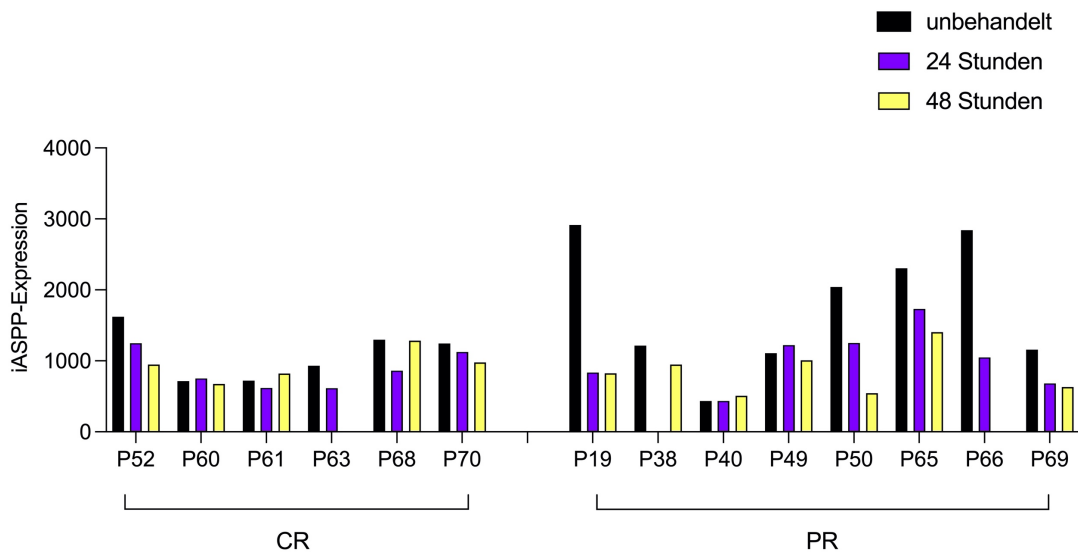
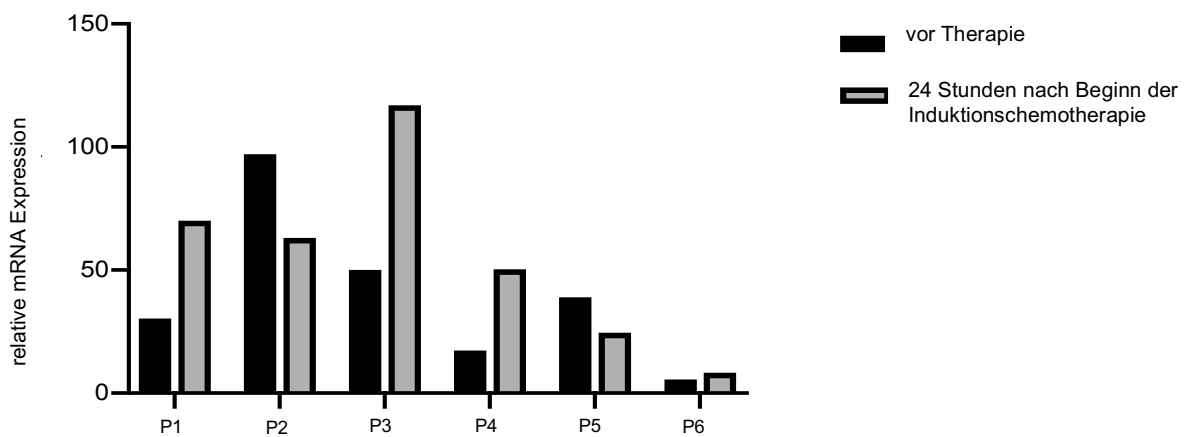


Abbildung 19: Bestimmung der iASPP-Expression mittels qRT-PCR vor Therapiebeginn und 24 Stunden nach Beginn der Induktionstherapie



Die Auswertung der erhobenen Daten ergab in statistischen Berechnungen keine formale Signifikanz. Hierfür wäre ein größeres Patientenkollektiv erforderlich. Sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in der qRT-PCR konnte unter Berücksichtigung des Therapieansprechens aufgrund der geringen Patientenzahl keine statistisch valide Schlussfolgerung gezogen werden.

3.2. Etablierung eines iASPP-knock-down (KD)-Zellmodells

Um die Rolle und Funktion von iASPP in akuten myeloischen Leukämien zu untersuchen, wurde ein Zellmodell mit supprimierter iASPP-Expression sowie Kontrollzellen, wie unter 2.5. beschrieben, etabliert. Die Präsenz des Fluoreszenz-Reporter-Proteins Turbo-GFP konnte nach 24 Stunden mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie erfolgreich festgestellt werden (Abbildung 20).

Abbildung 20: Fluoreszenz-positive Zellen als Nachweis erfolgreicher Virusproduktion

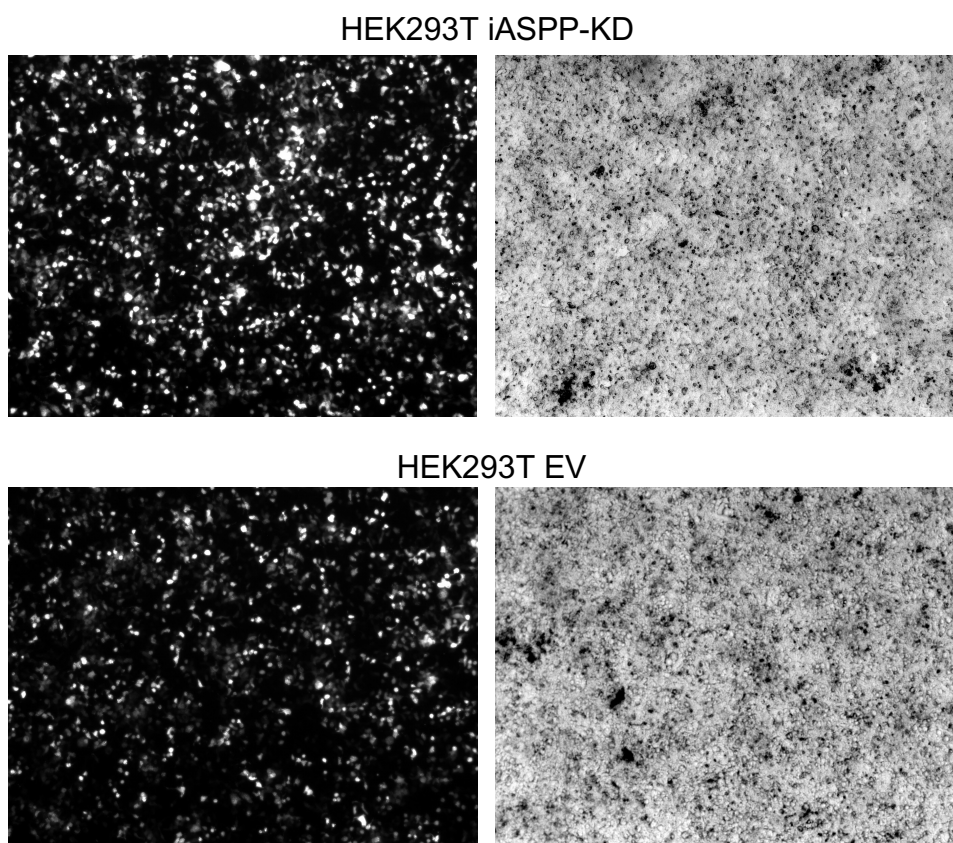


Abbildung 20 zeigt Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen der transfizierten HEK293T-Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit den Plasmiden iASPP-KD und EV (10-fach-Vergrößerung). Die Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop zeigen das Vorhandensein des Turbo-GFP-Markers in den Zellen, sodass eine Viruspartikelproduktion für die floureszierenden Zellen angenommen werden kann.

Die in den HEK293T-produzierten lentiviralen Vektoren iASPP-shRNA sowie EV-shRNA wurden im Folgenden in die AML-Zelllinie Molm14 und die ALL-Zelllinie

Jurkat transduziert. Die Jurkat-Zelllinie wurde als ALL-Zelllinie parallel und analog zur Evaluation der Rolle von iASPP im ALL-Modell untersucht.

Die Transduktionseffizienz konnte durch das Vorliegen des Fluoreszenz-Reporter-Proteins TurboGFP in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden (Abbildung 21 bzw. Abbildung 22).

In Abbildung 21 und Abbildung 22 findet sich rechts jeweils das Mikroskopiebild der transduzierten Zellkulturen im Hellfeld (10fache Vergrößerung). Die Bilder links zeigen in der Fluoreszenzmikroskopie die Darstellung des Fluoreszenz-Reporter-Proteins TurboGFP (10fache Vergrößerung).

Abbildung 21: Nachweis erfolgreicher Transduktion der Molm14-Zelllinie im Fluoreszenzmikroskop

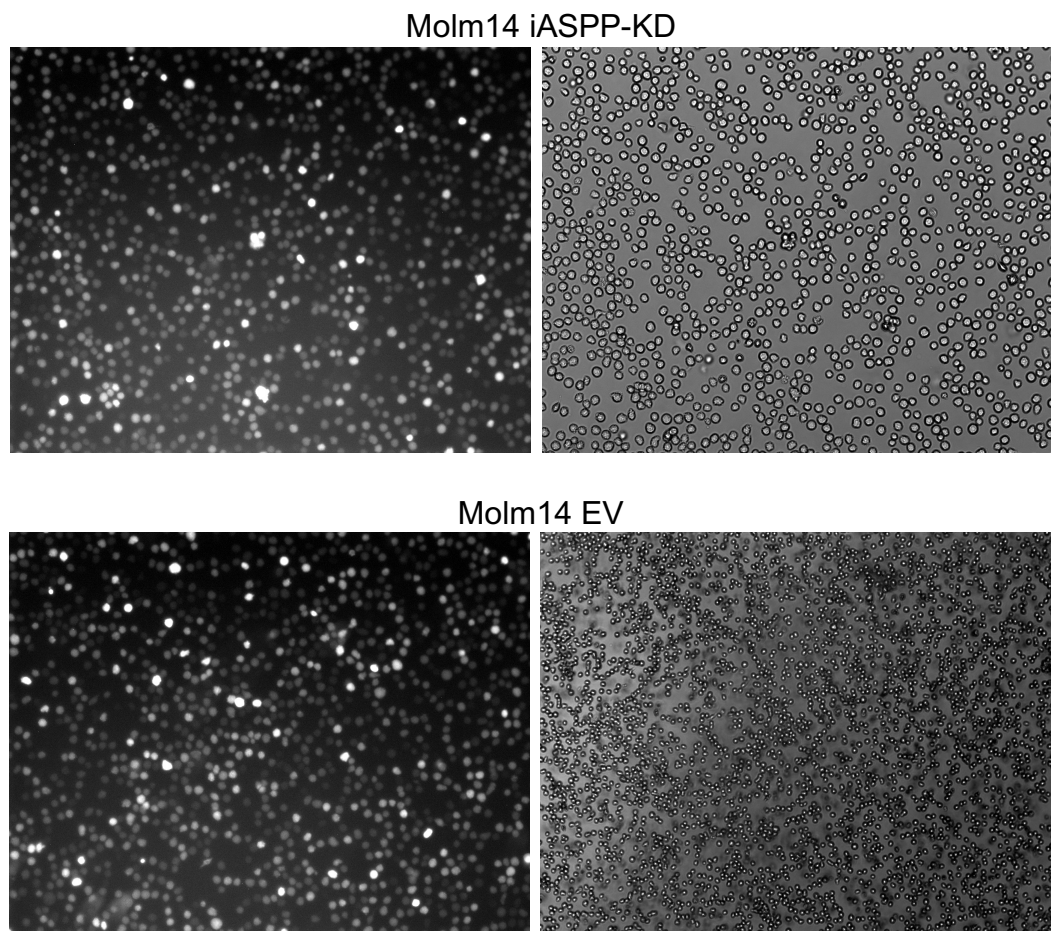
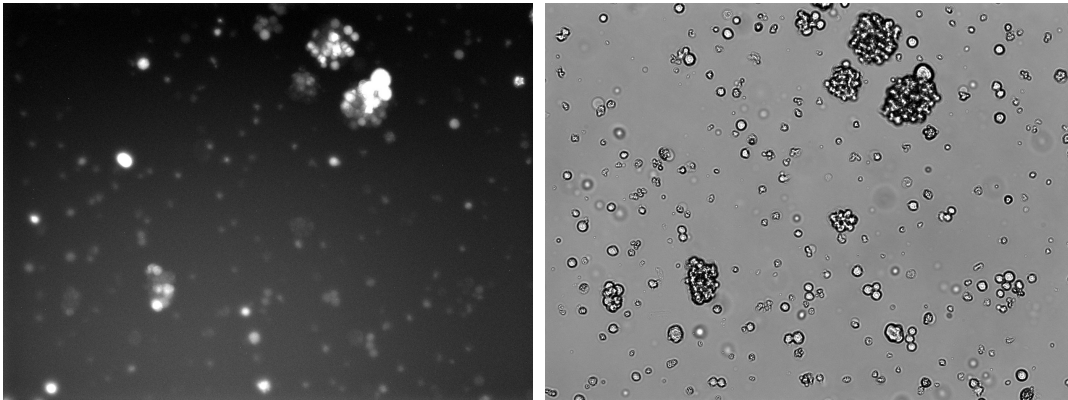
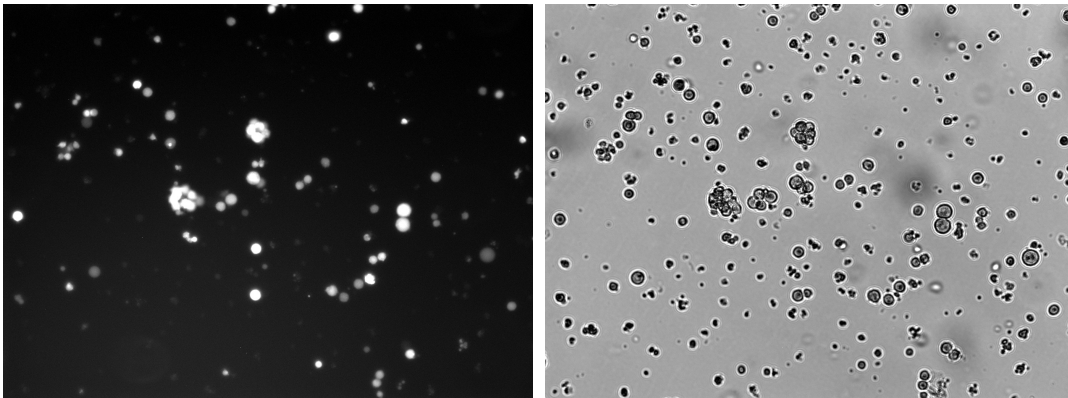


Abbildung 22: Nachweis erfolgreicher Transduktion der Jurkat-Zelllinie im Floureszenzmikroskop

Jurkat iASPP-KD

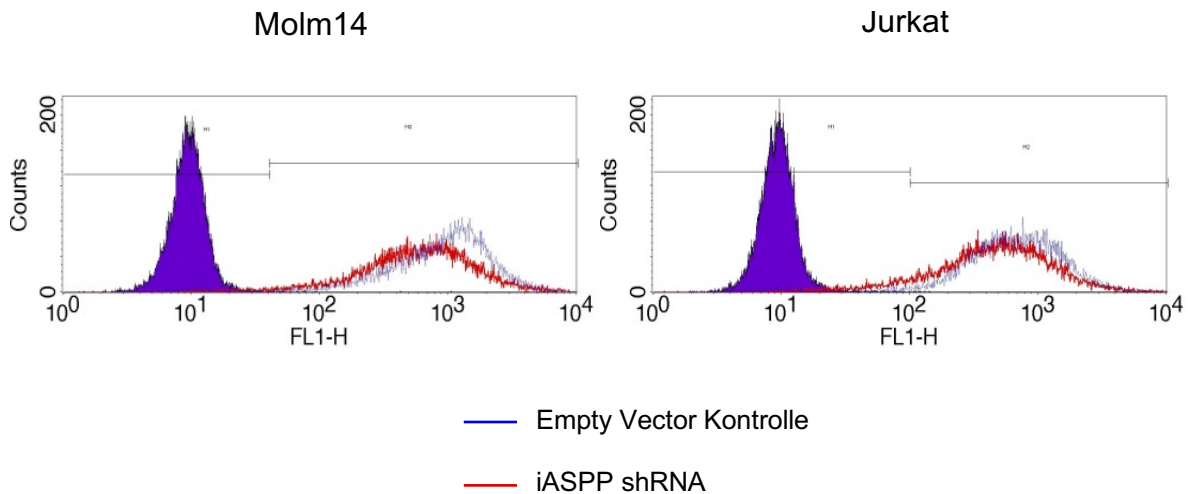


Jurkat EV



Im Vergleich zeigt sich eine hohe Transduktionsrate. In der Durchflusszytometrie zeigten die transduzierten Zellen für iASPP eine 99%ige Expression des GFP-Markers. Die Messung für die EV-Zellen ergab ebenso 99%. Somit konnte das Ergebnis der Floureszenzmikroskopie und eine suffiziente Transduktion der Plasmide bestätigt und in der Durchflusszytometrie quantifiziert werden (Abbildung 23).

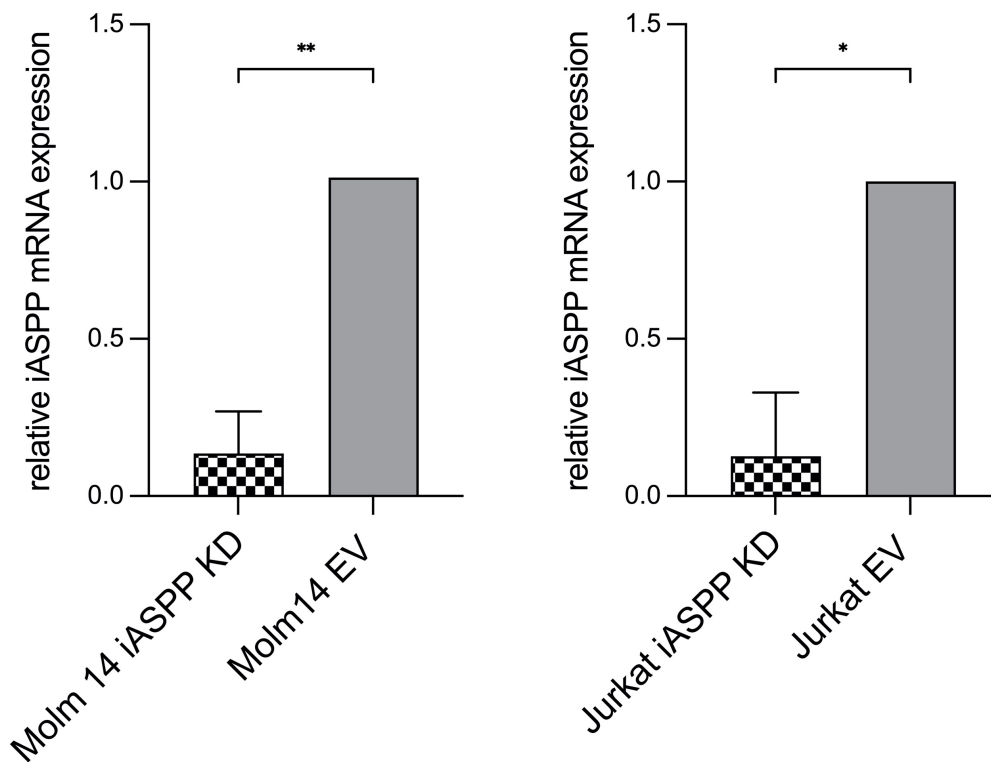
Abbildung 23: 99%ige Transduktionseffizienz



Die dunkelblau unterlegte Kurve in Abbildung 23 zeigt die jeweils nicht-transduzierten Zellen des jeweiligen Zellmodells. Die Zugehörigkeit der hellblau sowie rot dargestellten Kurven ist der in der Abbildung aufgeführten Legende zu entnehmen. Der Expressionsunterschied beruht auf dem Vorhandensein des fluoreszierenden GFP-Markers in den erfolgreich transduzierten Zellen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Transduktion der Plasmide erfolgreich gelungen ist, wurden die transduzierten Zellen auf eine erfolgreiche iASPP-Expressionssuppression hin untersucht. Abbildung 24 veranschaulicht die in der qRT-PCR ermittelten relativen iASPP-Expressionslevel; die Messwerte wurden auf die Expressionslevel der EV-Kontrollzellen normiert.

Abbildung 24: Signifikant supprimierte iASPP-Expression in den iASPP-KD-Zellmodellen der Zelllinien Molm14 und Jurkat



Die statistische Auswertung wurde mithilfe des t-Tests durchgeführt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Sowohl für das Molm14-iASPP-KD-Zellmodell als auch das Jurkat-iASPP-KD-Zellmodell konnte eine signifikante Suppression der Expression mittels qRT-PCR bestätigt werden. Für die Molm14-iASPP-KD-Zelllinien betrug die relative Expression 0,13; somit konnte eine Expressionsreduktion von 87 Prozent erzielt werden. Die korrespondierende relative iASPP-Expression der Jurkat-iASPP-KD-Zellen lag im Mittel bei 0,12, sodass auch hier von einer Expressionsreduktion von 88 Prozent ausgegangen werden kann.

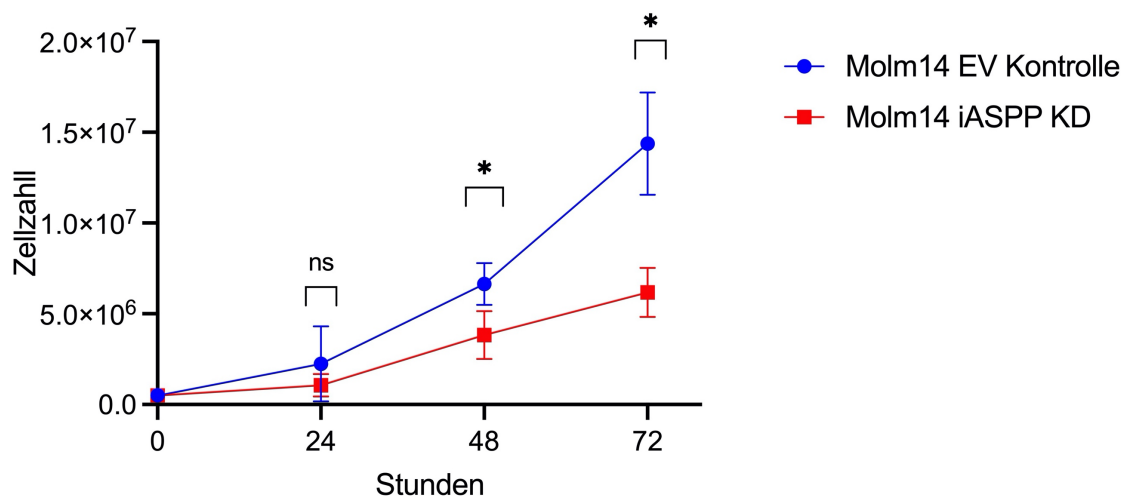
3.3. Die Rolle von iASPP im Molm14-AML-Zellmodell

3.3.1. Supprimierung der iASPP-Expression resultiert in reduzierter Proliferation

Bei der näheren Untersuchung des Molm14-iASPP-Zellmodells, wurde zunächst das Proliferationsverhalten untersucht.

In jeweils drei unabhängigen Versuchsansätzen ergaben sich die in Abbildung 25 aufgeführten Wachstumskurven. Es konnte im Vergleich zu der EV-Kontrolle eine signifikant reduzierte Proliferationskapazität beobachtet werden.

Abbildung 25: Signifikant verminderte Proliferationskapazität in den Molm14-iASPP-supprimierten-Zellen



Die x-Achse zeigt die Beobachtungszeitpunkte in Stunden, die y-Achse die bestimmte Zellzahl. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des t-Tests. Es ergaben sich folgende p-Werte: 24 Stunden = 0,453271; 48 Stunden = 0,027931; 72 Stunden = 0,0395.

Anhand der im o.g. Versuch gewonnenen Daten, wurde die Verdopplungszeit bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 17 dargestellt und zeigt eine niedrigere Verdopplungszeit für das iASPP-KD-Zellmodell der transduzierten Molm14-Zelllinie.

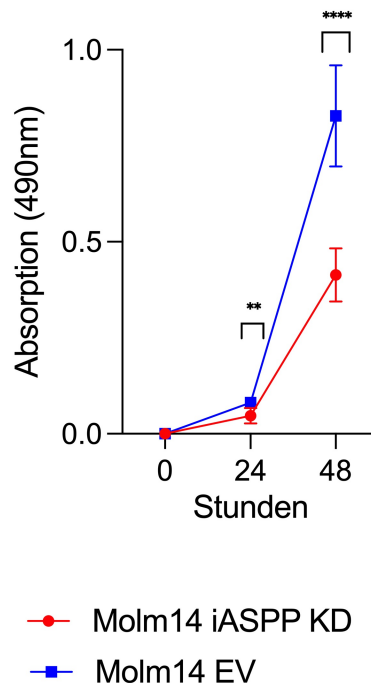
Tabelle 17: Signifikant Verminderte Wachstumskonstante sowie Verdopplungszeiten des Molm14-iASPP-KD-Zellmodells

Zelllinie	Verdopplungszeit t_D [h]	Wachstumskonstante k
Molm14 iASPP KD	16,35	0.042397
Molm14 EV	13,14	0.052769

Die Molm14 -ASPP-KD-Zellen zeigen eine signifikant längere Verdopplungszeit als die entsprechende EV-Kontrollzelllinie.

Das oben aufgeführte Ergebnis wurde mithilfe des XTT-Zellviabilitätsassays verifiziert (Abbildung 26).

Abbildung 26: Signifikant verminderter Metabolismus in den Molm14-iASPP-KD-Zellen im XTT



Die x-Achse veranschaulicht die Messzeitpunkte, die y-Achse stellt die relative Absorption dar. Die ermittelten p-Werte aus den statistischen Berechnungen mithilfe des t-Tests sind in der Grafik dargestellt und wie folgt zu interpretieren: ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$.

3.3.2. Supprimierung der iASPP-Expression korreliert signifikant mit höherer Apoptoseinduktion unter Chemotherapie im AML-Zellmodell

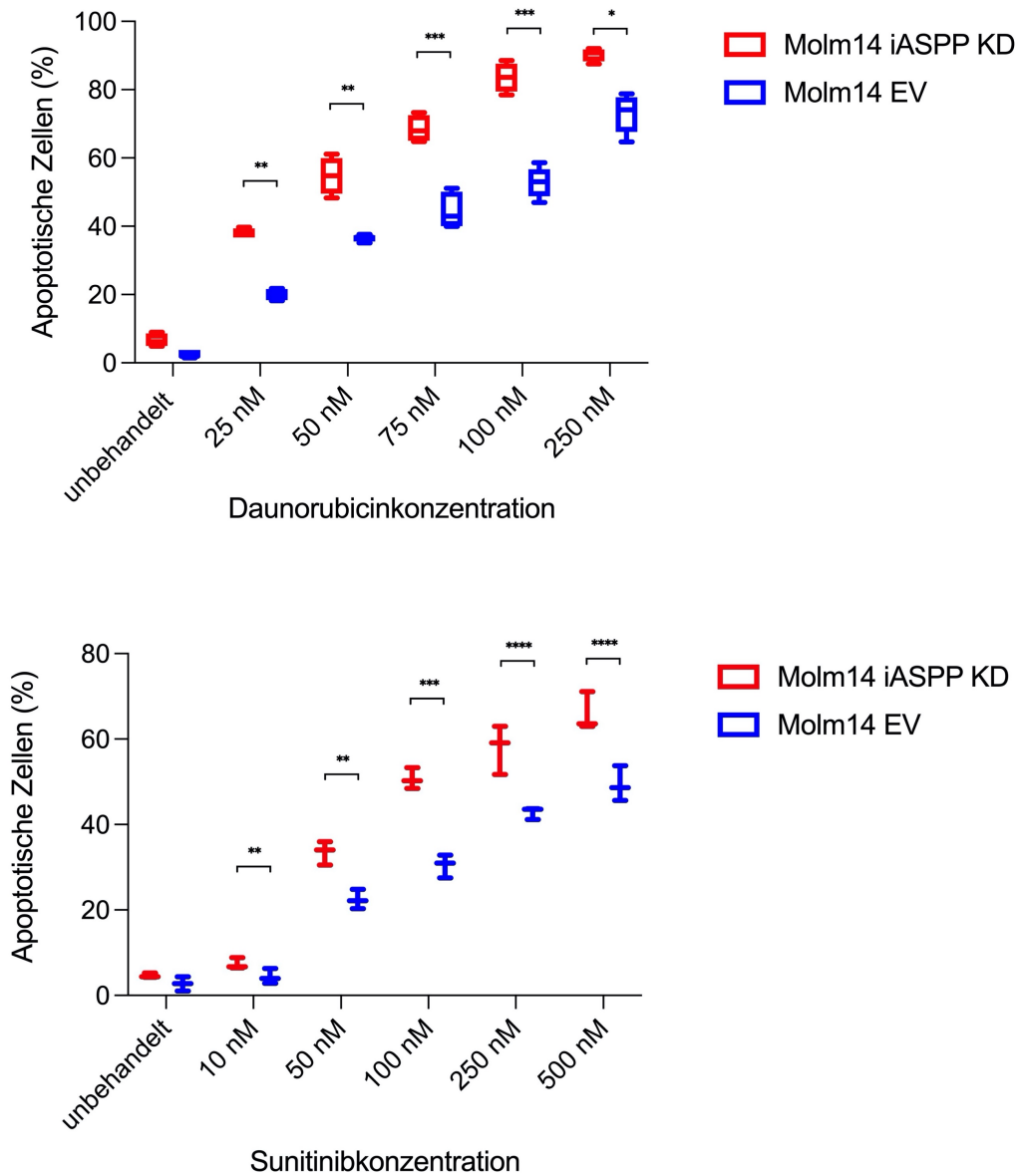
Nachdem die Proliferationsmessungen zeigten, dass die Suppression von iASPP zu einer verminderten Proliferationskapazität führt, wurde im weiteren Schritt der Zusammenhang zwischen iASPP-Expression und Apoptoseinduktion unter Applikation klassischer chemotherapeutischer Substanzen untersucht.

Für das Molm14-Zellmodell wurden die beiden Substanzen Daunorubicin sowie Sunitinib verwendet. Die Substanzwahl für die Behandlung der Zelllinie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib beruht auf der in der Zelllinie vorhandenen FLT3-ITD-Mutation [75]. Darüber hinaus, konnte Sunitinib in einer klinischen Phase I/II – Studie bei AML-Patienten mit Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation bereits klinisch erfolgreich eingesetzt werden [76].

Abbildung 27 demonstriert die mittels Durchflusszytometrie ermittelte Apoptoseinduktion für das Molm14-iASPP-Zellmodell nach Behandlung.

Es kann festgehalten werden, dass eine iASPP-Suppression, wie sie hier mittels shRNA im Zellmodell konstruiert wurde, mit einer statistisch signifikant höheren Apoptoseinduktion nach Behandlung mit chemotherapeutischen Substanzen einhergeht als dies in den Kontrollzellen der Fall ist. Die Molm14-iASPP-KD-Zellen zeigten unter Behandlung eine signifikant höhere Apoptoserate als die entsprechenden EV-Kontrollen. Diese Beobachtung wurde für alle untersuchten Behandlungskonzentrationen gemacht. Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism unter Anwendung des t-Tests durchgeführt.

Abbildung 27: Signifikant höhere Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Daunorubicin und Sunitinib im iASPP-KD-Zellmodell



Die jeweiligen Behandlungskonzentrationen sind auf der x-Achse angegeben, die y-Achse zeigt in Prozent an, in wie vielen Zellen im Versuchsansatz die Apoptose durch die Behandlung induziert wurde. Die ermittelten p-Werte aus den statistischen Berechnungen sind in der Grafik dargestellt und sind wie folgt zu interpretieren: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Die erhobenen Daten erlauben die Schlussfolgerung, dass eine hohe iASPP-Expression mit einer schlechteren Apoptoseinduktion verbunden ist.

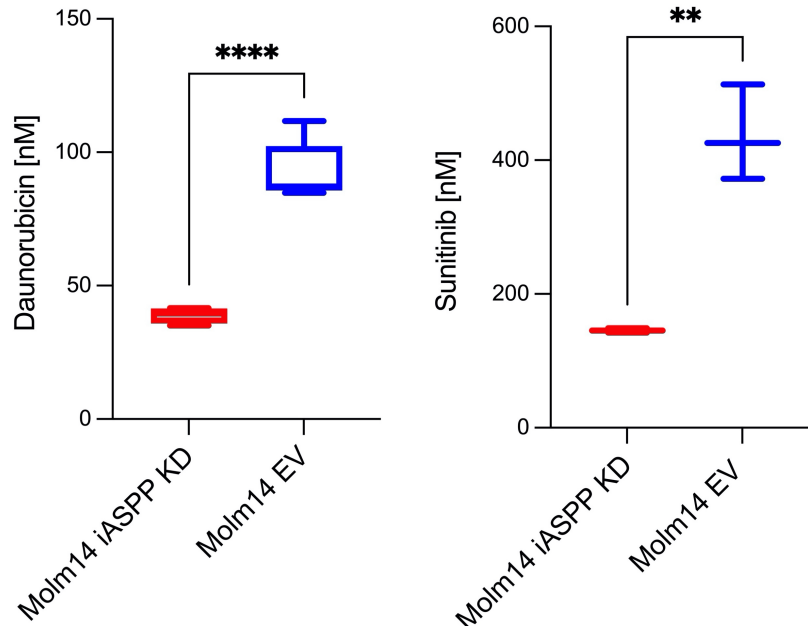
Tabelle 18 veranschaulicht die Apoptose mit Darstellung des IC₅₀-Wertes. Hierbei handelt es sich um die Wirkstoffkonzentration, bei der eine 50%ige Apoptoserate im Versuchsansatz erreicht wird.

Tabelle 18: Berechnete IC₅₀-Werte für das Molm14-iASPP-KD-Zellmodell

Zelllinie	Daunorubicin [nM]	Sunitinib [nM]
Molm14 iASPP KD	38,97	145,4
Molm14 EV	92,62	437,0

Für die iASPP-KD-Zellen ergeben die Berechnungen des IC₅₀-Wertes sowohl für Daunorubicin als auch Sunitinib signifikant geringere Behandlungskonzentrationen (vgl. Abbildung 28).

Abbildung 28: Signifikant geringere IC₅₀-Konzentration im iASPP-supprimierten Zellmodell



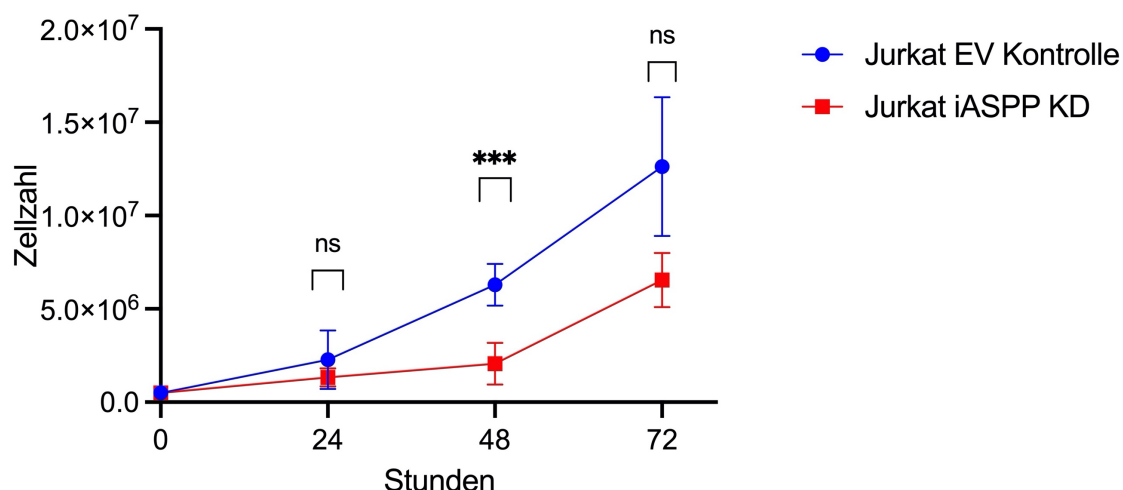
Die statistische Auswertung der berechneten IC₅₀-Werte für das iASPP-Zellmodell Molm14 erfolgte unter Anwendung des t-Tests. ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$.

3.4. Untersuchung von iASPP in der ALL-Zelllinie Jurkat

3.4.1. iASPP-Suppression führt zu signifikant verminderter Proliferationskapazität

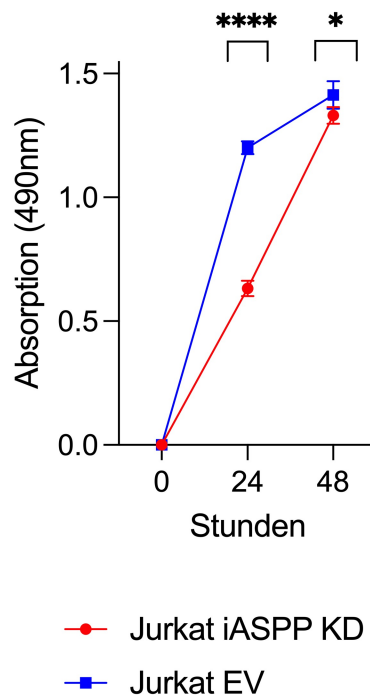
In Analogie zum Molm14-Zellmodell, wurde auch für die Jurkat-iASPP-KD-Zellen die Proliferation mittels Zellzählung bestimmt und im XTT-Assay überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 und Abbildung 30 veranschaulicht. Wie vermutet, war die Suppression der iASPP-Expression mit einer signifikant verminderten Proliferationskapazität assoziiert. Für den Zeitpunkt 72 Stunden war in der manuellen Zählung bei starker Streuung für die EV-Zellen keine statistische Signifikanz zu beobachten. In Tabelle 19 sind die berechneten Werte für Wachstumskonstante und Verdopplungszeit aufgeführt. Die Jurkat-iASPP-KD-Zellen zeigen hier eine nahezu doppelt so hohe Verdopplungszeit im Vergleich zu den Jurkat-EV-Kontrollzellen.

Abbildung 29: Jurkat-Zellen mit supprimierter iASPP-Expression proliferieren langsamer



Die x-Achse zeigt die Beobachtungszeitpunkte, die y-Achse die bestimmte Zellzahl. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des t-Test. Es ergaben sich folgende p-Werte: 24 Stunden = 0,428748; 48 Stunden = 0,0003; 72 Stunden = 0,163920.

Abbildung 30: Signifikant verminderter Metabolismus in den Jurkat-iASPP-KD-Zellen im XTT



Die x-Achse veranschaulicht die Messzeitpunkte, die y-Achse stellt die relative Absorption dar. Die ermittelten p-Werte aus den statistischen Berechnungen mithilfe des t-Tests sind in der Grafik dargestellt und sind wie folgt zu interpretieren: * $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$.

Tabelle 19: Reduzierte Wachstumskonstante sowie längere Verdopplungszeit des Jurkat-iASPP-KD-Zellmodells.

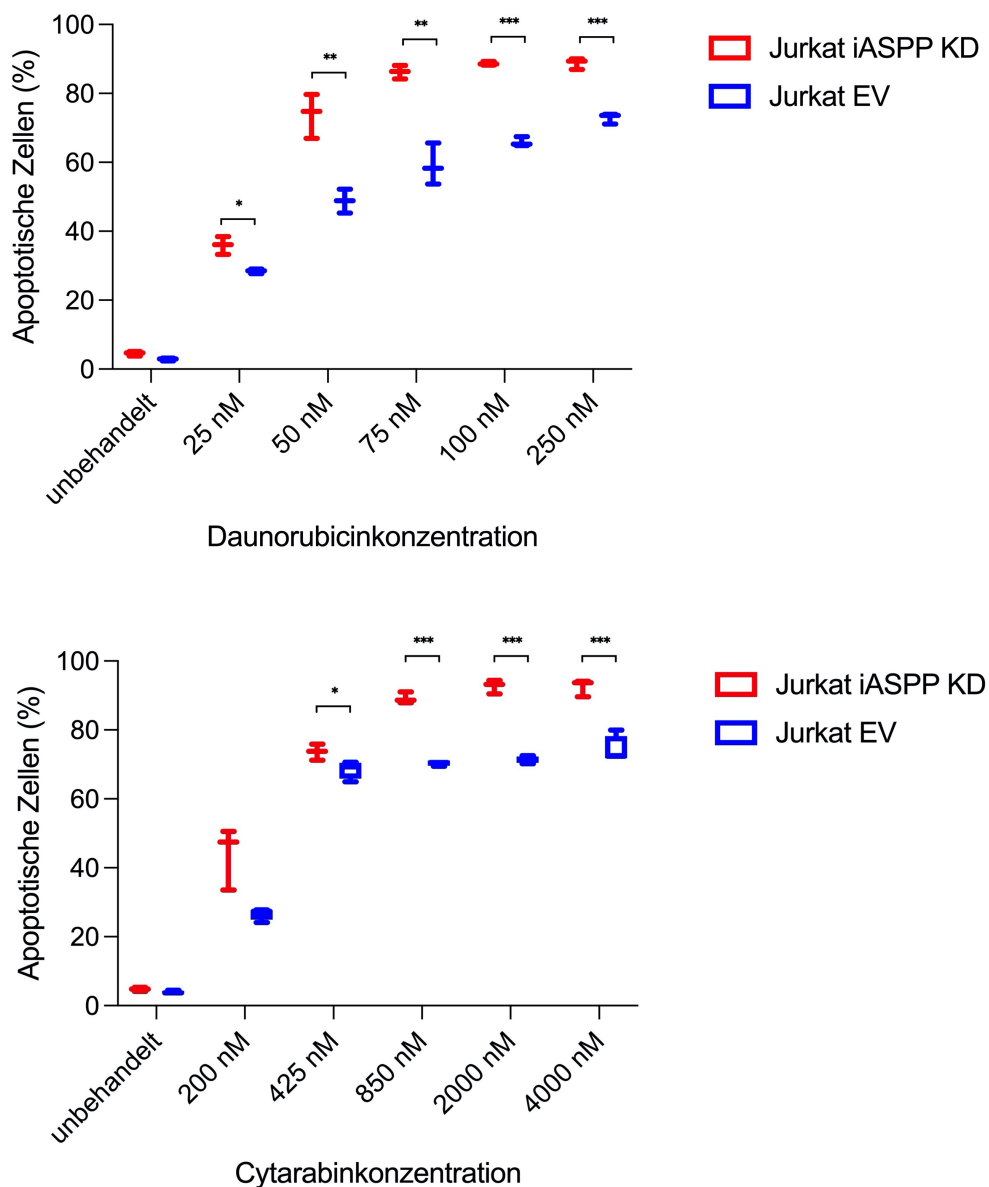
Zelllinie	Verdopplungszeit t_D [h]	Wachstumskonstante k
Jurkat iASPP KD	23,49	0.029510
Jurkat EV	13,13	0.052778

3.4.2. Supprimierung der iASPP-Expression korreliert signifikant mit höherer Apoptoseinduktion unter Chemotherapie im ALL-Zellmodell

Es wurde das gleiche Versuchsprinzip wie für das AML-Zellmodell befolgt: Für das Jurkat-Zellmodell wurden die iASPP-KD-Zellen und EV-Kontrollzellen mit Daunorubicin und Cytarabin behandelt und im Anschluss die Apoptoseinduktion

bestimmt. Die iASPP-KD-Jurkat-Zellen zeigten für beide verwendeten Chemotherapeutika eine signifikant höhere Apoptoseinduktion. Die Messergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt. Statistische Berechnungen unter Anwendung der Statistiksoftware GraphPad Prism ergaben eine statistische Signifikanz im t-Test.

Abbildung 31: Stärkere Apoptoseinduktion im Jurkat-KD-Zellmodell nach Behandlung mit Daunorubicin und Cytarabin.



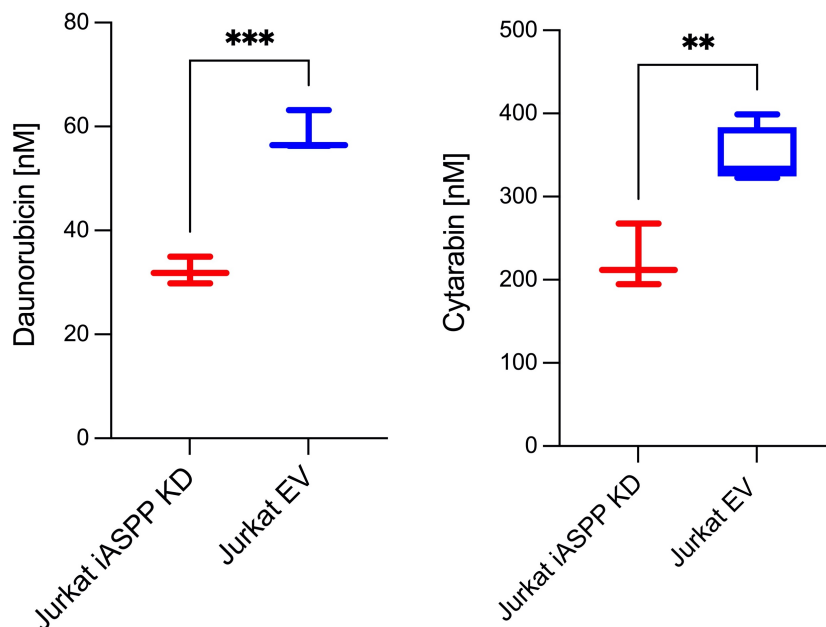
Die Versuchsdurchführung und Auswertung erfolgte analog Beschreibung unter Abbildung 30. Die ermittelten p-Werte aus den statistischen Berechnungen sind in der Grafik dargestellt und sind wie folgt zu interpretieren: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

In Tabelle 20 sind die Berechnungen der IC₅₀-Werte aufgeführt und zeigen für die Jurkat-KD-Zellen sowohl für Daunorubicin als auch für Cytarabin signifikant geringere Werte als für die EV-Kontrollen (s. Abbildung 32).

Tabelle 20: Berechnete IC₅₀-Werte für das Jurkat-iASPP-KD-Zellmodell

Zelllinie	Daunorubicin [nM]	Cytarabin [nM]
Jurkat iASPP KD	32,20	224,7
Jurkat EV	58,64	347,2

Abbildung 32: Signifikant niedrigere IC₅₀-Konzentration im iASPP-KD-ALL-Modell

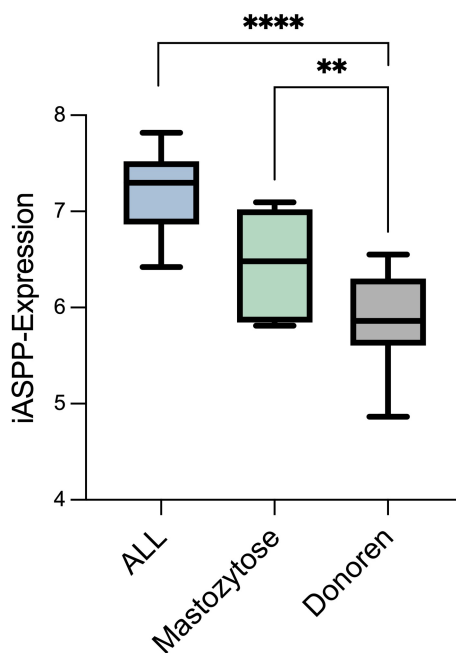


Die statistische Auswertung der berechneten IC₅₀-Werte für das iASPP-Zellmodell Jurkat erfolgte unter Anwendung des t-Tests. ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001.

3.5. Ausblick: iASPP in anderen hämatoonkologischen Entitäten

Nachdem die ALL-Zelllinie Jurkat eine erhöhte iASPP-Expression aufwies, wurden verfügbare Patientenproben von sechs ALL-Patienten sowie sechs Patienten mit Mastozytose untersucht. Die Expressionsbestimmung in der Durchflusszytometrie wurde analog den Messungen bei den AML-Patienten durchgeführt. Abbildung 33 zeigt die Auswertung. Als Kontrolle diente die gesunde Donorengruppe. Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Abbildung 33: Signifikant erhöhte iASPP-Expression bei Patienten mit ALL und Mastozytose



Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Test. ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$.

Unter Vorbehalt der nur sehr geringen Patientenzahl für beide Entitäten, zeigten die verfügbaren Proben, dass die iASPP-Expression sowohl in ALL- als auch in Mastozytose-Patienten signifikant gegenüber der gesunden Kohorte erhöht ist. Dieses Ergebnis bietet die Rationale für weiterführende Untersuchungen in größeren Patientenkohorten für beide Entitäten. Hierfür sind Folgeprojekte geplant.

4. Diskussion

Die akute myeloische Leukämie ist weiterhin die häufigste hämatologische Neoplasie mit dem schlechtesten klinischen Verlauf.

Aberrante Expressionslevel wurden für alle drei Familienmitglieder der Apoptose-Stimulierenden Proteine von p53 (ASPP)-Proteinfamilie durch diverse Forschungsgruppen in verschiedenen Tumorentitäten festgestellt, sodass deren Bedeutung in Tumorerkrankungen nicht von der Hand zu weisen ist [40 - 49].

In dieser Arbeit wurde die Expression von iASPP, dem inhibitorischen Mitglied der Apoptose-stimulierenden Proteine von p53 [40], in der AML untersucht. Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass TP53 in akuten myeloischen Leukämien überwiegend in Wildtypform vorliegt [33-38], sind die ASPP-Proteine als potentiell zentrale Drehscheibe der Apoptoseinaktivierung von wissenschaftlichem Interesse.

Eine erhöhte iASPP-Expression konnte bereits in anderen Tumorentitäten gezeigt werden, wobei eine erhöhte iASPP-Expression mit schlechterem Therapieansprechen und einer schlechteren Prognose verbunden war, u.a. im Nierenzellkarzinom [41], Zervixkarzinom [44] und in Kopf-Hals-Tumoren [60].

4.1. Signifikant erhöhte iASPP-Expression in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

Insbesondere in Anlehnung an die in der Vergangenheit erhobenen Daten der Arbeitsgruppe um PD Dr. med. K. Kampa-Schittenhelm bezüglich des Proteinfamilienmitgliedes ASPP2, verstärkt sich die Arbeitshypothese, wonach eine erhöhte Expression von iASPP in akuten myeloischen Leukämien an der Apoptosedysregulation und somit auch an der Expansion des malignen Klons mutmaßlich in unbekanntem Umfang beteiligt ist. Hier wurde in der Publikation von Schittenhelm et al. [65] eine verminderte Expression des proapoptotischen

Tumorsuppressors ASPP2 in *de novo* akuten myeloischen Leukämien nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnte eine signifikant erhöhte iASPP-Expression in Blasten von AML-Patienten verglichen mit monozytären Zellen gesunder Probanden beobachtet werden. Unsere Messungen wurden sowohl mittels qRT-PCR als auch mittels Immunfärbung, d.h. auf RNA- und Proteinebene, durchgeführt. Hierbei bestand kein Expressionsunterschied von iASPP in Blasten aus peripherem Blut und Knochenmark.

Damit befinden sich unsere Untersuchungen im Einklang mit den Arbeiten von Cheng et al. [62] und Zhang et al. [67].

4.2. Subgruppenanalyse im Kontext mit der iASPP-Expression bei AML-Patienten

Bei der näheren Betrachtung der untersuchten Patientenkohorte, wurde der Versuch unternommen, phänotypische Merkmale zu identifizieren, welche statistisch signifikant mit einer hohen iASPP-Expression koinzidieren. Bei der Auswahl der betrachteten Merkmale wurden neben AML-typischen molekulargenetischen Charakteristika auch laborchemische und allgemeine klinische Aspekte betrachtet. Bei dieser Auswertung wurde in der untersuchten Kohorte zwischen AML-Erstdiagnose und AML-Rezidiven unterschieden. Unter den AML-Erstdiagnosen wurde zudem zwischen der primären *de novo* AML und der sekundären AML unterschieden.

4.2.1. Signifikant höhere iASPP Expression in sekundärer AML und AML-Rezidiv als in *de novo* AML

Bei der Untersuchung der iASPP-Expression von Patienten mit *de novo* AML konnte festgestellt werden, dass diese Patienten im Vergleich zu jenen mit sekundärer AML bzw. AML-Rezidiv signifikant geringere Expressionslevel zeigten. Der Vergleich von sekundärer AML und AML-Rezidiv hingegen zeigte keinen signifikanten iASPP-Expressionsunterschied. Dies untermauert die bestehende Literatur, wonach die iASPP-Expression mit einem aggressiveren

Zellverhalten des malignen Klons einhergeht [40] und deckt sich mit unserer Arbeitshypothese. Die Tatsache, dass sekundäre Leukämien auf dem Boden von vorangehenden Knochenmarkerkrankungen mit bereits bestehenden molekulargenetischen Aberrationen entstehen und daher im Vergleich zur *de novo* AML eine schlechtere Prognose haben [2], ist ebenso kongruent mit den hier vorliegenden Daten für iASPP.

4.2.2. Korrelation der iASPP-Expression mit dem späteren Remissionsstatus

Von immenser Bedeutung war zudem die Auswertung, ob ein Zusammenhang zwischen der iASPP-Expression und dem Therapieansprechen vorliegt, zumal dies eine Evaluation der Remissionschancen bereits vor Therapiebeginn erlauben würde. Ein solcher Kontext konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten statistischen Berechnungen jedoch nicht nachwiesen werden, der p-Wert lag bei 0,23. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die verhältnismäßig geringe Patientenzahl zurückzuführen

4.2.3. Patienten mit günstigem Risikoprofil analog ELN-Kategorisierung zeigen eine geringere iASPP-Expression

Bei der Berücksichtigung der ELN-Klassifikation im Kontext mit der iASPP-Expression zeigte sich ein interessantes Ergebnis: Patienten mit einem intermediären bzw. Hochrisikoprofil wiesen eine signifikant höhere iASPP-Expression als jene mit einem günstigen Risikoprofil analog ELN-Risikostratifizierung [10] auf. Der Vergleich der Hochrisikogruppe mit der Subgruppe mit intermediärem Risikoprofil zeigte jedoch keinen signifikanten iASPP-Expressionsunterschied. Dies beruht vermutlich darauf, dass die Fallzahl relativ gering war und in der Gruppe mit ungünstigem Risikoprofil eine starke individuelle Streuung vorlag.

4.2.4. Inverse Korrelation der iASPP-Expression mit Laktatdehydrogenase, Leukozytenzahl und Blastenanteil im Blut

Bei der Auswertung der laborchemischen Parameter zeigte sich, dass die iASPP-Expression bei AML-Erstdiagnose invers mit der im Blut bestimmten Leukozytenzahl und der Laktatdehydrogenase korrelierte. Die statistische Berechnung ergab einen signifikanten Zusammenhang in beiden Fällen.

Im Einklang hiermit zeigten auch die AML-Rezidive eine inverse Korrelation der iASPP-Expression mit der Laktatdehydrogenase; zudem war eine ebenfalls signifikante inverse Korrelation der iASPP-Expression mit dem Blastenanteil im Blut zu beobachten.

Diese Ergebnisse sind überraschend in Anbetracht der Arbeitshypothese, dass eine hohe iASPP-Expression mit einem aggressiveren Proliferationsverhalten und Krankheitsverlauf assoziiert ist und dies auch für die zuvor genannten korrelierenden Laborparameter bekannt ist [1].

Bei der Unterscheidung zwischen *de novo* AML und sekundärer AML innerhalb der AML-Erstdiagnosen konnte statistisch kein signifikanter Zusammenhang bei allen ausgewerteten klinischen Parametern beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich auf die breite Streuung und die geringe Fallzahl in den Subgruppen zurückzuführen.

Welche molekularbiologischen Ursachen diesen Daten zugrunde liegen ist bislang unklar und muss zukünftig in weiteren Experimenten untersucht werden. Eine Möglichkeit wäre, dass es sich bei iASPP tatsächlich um einen unabhängigen Prognosemarker handelt. Dies wird aktuell in einer größeren Studienkohorte evaluiert.

Die Analyse und Interpretation der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgt unter Vorbehalt, da es sich für diese Zwecke um eine kleine untersuchte Patientenkohorte handelt. Es ist eine deutlich höhere Fallzahl erforderlich, um die Bedeutung der übrigen Subgruppen in Verbindung mit der iASPP-Expression zu analysieren und um eine Korrelation entweder zu bestätigen oder gänzlich auszuschließen.

4.3. iASPP-Expression führt zu gesteigerter Zellproliferation

Nach erfolgreicher Etablierung unseres iASPP-Zellmodells wurden Versuche zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens durchgeführt. Die beiden transduzierten Zelllinien Molm14 und Jurkat zeigten nach supprimierter iASPP-Expression eine signifikant verminderte Proliferationsaktivität als die Kontrolle. Dies konnte sowohl in der manuellen Zellzählung als auch mithilfe des XTT-Assays beobachtet werden. Diese Daten sind kongruent mit weiteren publizierten Arbeiten: So zeigten Liu et al. analoge klinische Daten für Kopf-Hals-Tumoren [60]. Zudem wurden Beobachtungen für eine gesteigerte Proliferation bei erhöhter iASPP-Expression in weiteren Tumorentitäten, wie im Nierenzellkarzinom [41], gemacht.

In dieser Dissertationsarbeit konnten diese Ergebnisse sowohl in der AML-Zelllinie Molm14 als auch in der ALL-Zelllinie Jurkat gezeigt werden.

Wie allerdings die erhöhte iASPP-Expression molekularbiologisch zum aggressiveren Zellwachstum führt, ist bislang noch nicht abschließend geklärt und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Vermuten könnte man auch hier einen Einfluss von iASPP auf Zellzykluscheckpoints, welche über p53 reguliert werden.

4.4. Erhöhte iASPP-Expression ist mit reduziertem Ansprechen auf chemotherapeutische Substanzen im Zellmodell assoziiert

Nachdem erste Experimente ein aggressiveres Proliferationsverhalten offenlegten, wurde im nächsten Schritt der Stellenwert der iASPP-Expression für die Apoptoseinduktion evaluiert.

Die Suppression der iASPP-Expression führt in beiden KD-Zellmodellen zu signifikant geringeren IC_{50} -Konzentrationen im Vergleich zu den EV-Kontrollen. Im Molm14-iASPP-KD-Zellmodell ergab sich unter Anwendung von Daunorubicin ein IC_{50} -Wert von 92,62 nM für die EV-Zellen und 38,97 nM für iASPP-KD-Zellen. Eindrücklich war der Unterschied für die Behandlung auch bei Sunitinib: Der IC_{50} -Wert lag hier für das iASPP-KD-Zellmodell bei 145,4 nM, für die EV-Kontrolle bei 437,0 nM. Für das untersuchte ALL-Zellmodell ergaben sich bei den Jurkat-

iASPP-KD-Zellen ebenso signifikant geringere IC₅₀-Werte für Daunorubicin und Cytarabin.

Die hier erhobenen IC₅₀-Werte sind deutlich höher als in der Literatur beschrieben. Dies könnte mit der vorangehenden Manipulation an den Zellen, wie die initiale Transduktion und anschließende Selektion, zusammenhängen.

Analoge Beobachtungen *in vitro* sind in der Literatur für andere Tumorentitäten bereits beschrieben: Eine erhöhte iASPP-Expression war mit einer reduzierten Apoptoseinduktion unter Behandlung mit chemotherapeutischen Substanzen verbunden [40,44,60].

Aufgrund seiner inhibitorischen Funktion, ist eine höhere Apoptoseinduktion nach iASPP-Expressions-suppression und hiermit verbundener Reaktivierung des p53-Pathways zu erwarten. In den vorliegenden Daten konnte dies gezeigt werden. Möglicherweise beruhen diese Ergebnisse auf einem iASPP-getriggerten Resistenzmechanismus. Bis dato sind diesbezüglich keine eindeutigen Daten publiziert worden.

Diese Resultate untermauern die Bedeutung von iASPP in der AML und sollten als potenzielles neues Therapietarget der AML untersucht werden.

4.5. iASPP-Expression in Patienten im Therapieverlauf

Unter Berücksichtigung, dass bei hohen iASPP-Expressionen eine reduzierte Apoptoseinduktion unter Applikation chemotherapeutischer Substanzen *in vitro* vorliegt, ergibt sich für den Transfer dieser Theorie in die Klinik die Arbeitshypothese, dass eine höhere iASPP-Expression *in vivo* mit einem schlechten Therapieansprechen unter Induktionschemotherapie verbunden ist.

Daher wurde im nächsten Schritt der Verlauf der iASPP-Expression unter Induktionschemotherapie *in vivo* untersucht. Hierfür erfolgte die Expressionsmessung 24 und 48 Stunden nach Beginn der Induktionschemotherapie mithilfe von Durchflusszytometrie und qRT-PCR.

Die Behandlung von Zelllinien akuter Leukämien mit Chemotherapeutika zeigte im Vorfeld Veränderungen der iASPP-Expression unter Chemotherapie (Abbildung 17).

In Untersuchungen unserer Patientenproben konnte beobachtet werden, dass individuell ein Anstieg bzw. Abfall der iASPP-Expression unter Induktionstherapie zu verzeichnen war (vgl. Abbildung 18 und 19). Eine Korrelation mit der ELN-Klassifizierung, wonach Patienten mit einem günstigen Risikoprofil einen stärkeren iASPP-Expressionsabfall zeigen würden, oder dem Therapieansprechen gelang leider nicht mit statistischer Signifikanz. In Abbildung 19 sind exemplarisch die Messungen mittel qRT-PCR für sechs Patienten dargestellt: So zeigten Patient 1, Patient 3 und Patient 4 in der Verlaufsbeobachtung ein schlechtes Therapieansprechen. Patient 2 und Patient 5 und Patient 6 hingegen zeigten ein gutes Therapieansprechen. Als schlechtes Therapieansprechen galt in dieser Auswertung der weitere Nachweis oder sogar die Zunahme an leukämischen Blasten im Knochenmark an Tag 15 der Induktionstherapie; bei einem guten Therapieansprechen waren zum betreffenden Zeitpunkt keine Blasten mehr im Knochenmark nachweisbar. Somit zeichnet sich hier eine interessante Tendenz ab. Allerdings müssen diese Daten in einem größeren definierten Patientenkollektiv untersucht werden.

Entsprechende Untersuchungen sind bislang noch nicht publiziert worden, sodass diese Fragestellung für zukünftige Studien weiterhin offenbleibt. Derartige Zusammenhänge stellen einen potenziell hochrelevanten Aspekt im klinischen Alltag zur frühzeitigen Evaluation des Therapieansprechens dar. Für den Fall, dass ein solcher Marker für das Therapiemonitoring etabliert werden könnte, ergibt sich die Möglichkeit, eine frühzeitige Modifikation des Therapieregimes mit unter Umständen verbesserter Prognose für den Patienten zu unternehmen.

4.6. Probengewinnung

Die Aufstellung einer adäquaten, beurteilbaren Kohorte für die beschriebenen Untersuchungen ist allerdings nicht unproblematisch. Initial kommt es im Rahmen der Induktionstherapie in der Regel zu einem sehr starken Abfall der Blasten im Blut. Somit konnte oftmals nicht genügend Zellmaterial aus den Proben isoliert werden. Zudem bedingt die zytotoxische Therapie

Veränderungen aller Blutzellen, sodass im Verlauf eine exakte Identifizierung der Blastenpopulation erschwert ist.

Darüber hinaus bieten sich logistisch erschwerte Bedingungen, wonach eine einheitliche Einhaltung der definierten Messzeitpunkte nach Therapieinitiierung häufig nicht exakt möglich war.

4.7. iASPP in ALL und Mastozytose

Neben der AML-Zelllinie Molm14, konnte im ALL-Zellmodell mithilfe der Jurkat-Zelllinie die Rolle von iASPP in der ALL beleuchtet werden. Anhand einer kleinen Patientenzahl wurde die iASPP-Expression in Patienten mit ALL bestimmt. Hier zeigte sich eine deutlich erhöhte iASPP-Expression verglichen mit der gesunden Donorkohorte. Da die Inzidenz der ALL primär im Kindes- und Jugendalter hoch ist (Kompetenznetz Leukämie *Häufigkeiten von Leukämien in Deutschland*, Stand Oktober 2021 [4]) spiegelt dieses Ergebnis für iASPP in der ALL einen potenziell hochrelevanten Aspekt für die Forschung der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie dar.

Aufgrund der Verfügbarkeit des Materials, wurden wenige Patienten mit systemischer Mastozytose auf ihre iASPP-Expression hin untersucht. Das Ergebnis für ALL und AML konnte auch hier in Analogie reproduziert werden. Neben relevanten Signalwegen, wie beispielsweise das typische Vorliegen einer Mutation im *KIT*-Gen, scheint auch bei Patienten mit Mastozytose eine Dysregulation der iASPP-Expression vorzuliegen.

Für konkretere Aussagen und Analysen ist allerdings eine Kollektiverweiterung unumgänglich. Eine Interaktion oder ein Zusammenhang zwischen *KIT* und iASPP wurde bis dato noch nicht beschrieben.

4.8. Résumé

Die Analyse von iASPP in AML-Patienten sowie die Untersuchung der Funktion in einem etablierten Zellmodell führte zur Erhebung von interessanten und zukünftig potentiell hochrelevanten Daten für den klinischen Alltag.

In den untersuchten AML-Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Donor-Knochenmarkszellen eine signifikant aberrante Expression von iASPP gezeigt

werden. Statistische Auswertungen legten einen Zusammenhang der hohen iASPP-Expression mit einem schlechteren Risikoprofil dar. Patienten mit *de novo* AML zeigten zudem eine deutlich geringere iASPP-Expression als Patienten mit sekundärer AML bzw. AML-Rezidiv. Dies legt die Annahme nahe, dass es bei Patienten mit sekundärer AML bzw. AML-Rezidiv in der Zelle neben den bestehenden molekulargenetischen Aberrationen zu weiteren genetischen, molekulargenetischen oder epigenetischen Modifikationen gekommen ist, die eine höhere iASPP-Expression entweder unterstützen oder direkt bedingen könnten.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten rücken die Bedeutung der iASPP-Expression im Verständnis der Leukämogenese sowie in der AML-Therapie stärker in den Fokus. Die signifikant erhöhte iASPP-Expression in AML-Patienten per se, stellt einen wichtigen Aspekt dar, sowohl für den klinischen Alltag als auch für das Verständnis der AML. Nur in etwa 5-10 % der Fälle zeigt sich bei der AML eine *TP53*-Mutation [33 – 38], sodass alternative Inhibitionsmechanismen des p53-Pathways unabhängig von einer *TP53*-Mutation immens an Bedeutung gewinnen.

Die ASPP-Proteinfamilie ist ein interessanter Ansatzpunkt, iASPP als das einzige antiapoptotische Familienmitglied im Besonderen. Eine mögliche Hypothese der Leukämogenese könnte die Inaktivierung des p53-Pathways durch eine Überexpression von iASPP und damit verbunden eine Akkumulation von Mutationen im Verlauf sein. Im weiteren Verlauf wäre dann die Expansion dieses malignen Klons und schließlich das klinische Bild einer AML zu erwarten. Die in der Zeit der Evolution stark konservierte Form von iASPP legt nahe, dass es sich bei iASPP um ein lebenswichtiges Protein in der Zellhomöostase handelt [40].

Die Rolle von iASPP bei der AML und Tumorerkrankungen im Allgemeinen stellt sich höchst komplex dar. Insbesondere das Verständnis von Regulationsstellen und -mechanismen sind für iASPP nur unzureichend bekannt und erfordern weitere wissenschaftliche Forschung auf diesem Gebiet. Für GATA2 als

regulatorischer Transkriptionsfaktor für iASPP wurde eine Arbeit von Xing et al. publiziert [79]. Darüber hinaus gibt es in der Literatur keine weiteren nennenswerten Informationen im Hinblick auf die iASPP-Expressionsregulation. Eine aberrante Promotormethylierung, wie sie bereits für ASPP2 gezeigt wurde, wurde für iASPP bislang nicht berichtet. In Plattenepithelkarzinomen der Haut wurde eine epigenetische Regulation von iASPP bei Interaktion mit p63 beschrieben [77]. Dennoch, sind die direkten bzw. auch indirekten Regulationsmechanismen, die eine physiologische bzw. aberrante, pathologische iASPP-Expression bei Tumorerkrankungen bedingen, bis dato noch nicht verstanden.

Darüber hinaus ist es gelungen, im iASPP-Zellmodell den Kontext zwischen der iASPP-Expression und aggressivem Tumorwachstum zu zeigen sowie die antiapoptotische Rolle von iASPP unter Applikation einer chemotherapeutischen Substanz nachzuvollziehen. Diese Erkenntnis hat im Hinblick auf klinische Aspekte und die Extrapolation der Informationen bei Diagnosestellung auf Therapiekonzepte potenziell eine hohe Relevanz.

Publizierte Daten beschreiben eine Rekonvaleszenz der p53-Funktion durch eine Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9)-Inhibitoren induzierte Transkriptionssuppression von iASPP in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 [61]. Ge et al. schreiben iASPP eine zentrale Schlüsselrolle zu, wonach es antiapoptotische Funktion durch selektive Inhibition von p53 oder aber proapoptotische Funktion durch selektive Inhibition von NF- κ B annehmen kann [78]. Diese Zusammenhänge könnten auch in der AML in zukünftigen Studien näher beleuchtet werden.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass alle Familienmitglieder der ASPP-Proteinfamilie in der Entität der akuten myeloischen Leukämie einer Dysregulation unterliegen [62,64,65,66]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen diese Tatsache für iASPP: Worauf diese veränderten Expressionen exakt beruhen und in welchem Kontext sie zur Leukämogenese sowie dem Ansprechverhalten auf Standardtherapiekonzepte stehen, erfordert

weiterführende Untersuchungen in der Zukunft. Darüber hinaus, stellt iASPP als potentieller prognostischer Marker für die AML eine attraktive Möglichkeit für zukünftiges Screening und Therapiemonitoring dar.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die akute myeloische Leukämie ist die häufigste Form der akuten Leukämien im Erwachsenenalter. Verglichen mit anderen onkologischen Entitäten, weist allerdings nur ein sehr geringer Anteil der Patienten eine inaktivierende Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* auf. Für das Verständnis, weshalb es dennoch zu einer verminderten p53-Funktion in der AML kommen kann, spielen die Apoptose-Stimulierenden Proteine von p53 (ASPP) als Aktivatoren und Inhibitoren der p53-abhängigen Signalkaskade eine wichtige Rolle. Das einzige antiapoptotische Proteinfamilienmitglied inhibitory ASPP (iASPP) wurde in dieser Arbeit auf seine Expression und funktionelle Rolle in der akuten myeloischen Leukämie hin untersucht.

Mit statistischer Signifikanz zeigten die durchgeführten Messungen sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene, dass eine erhöhte iASPP-Expression in AML-Blasten von Patienten im Vergleich zu monozytären Zellen gesunder Knochenmarkspender vorliegt. Darüber hinaus war die iASPP-Expression in sekundären AMLs und in AML-Rezidiven nochmals signifikant höher als in *de novo* AMLs.

Ein Zusammenhang zwischen dem Risikoprofil analog ELN-Klassifikation bestand mit statistischer Signifikanz: Patienten mit einem günstigen Risikoprofil zeigten eine geringere iASPP-Expression verglichen mit Patienten mit intermediärem und Hochrisikoprofil.

Die Analyse der Entwicklung der iASPP-Expression unter Therapie erlaubte aufgrund der geringen Fallzahl keine statistisch validen Aussagen.

Nach Etablierung eines iASPP-knock-down-Zellmodells, wurde die funktionelle Rolle von iASPP im Hinblick auf Apoptoseverhalten und Zellproliferation analysiert. Sowohl im AML- als auch im ALL-Zellmodell war die iASPP-Expressionssuppression signifikant mit einer höheren Apoptoseinduktion und längeren Zellverdopplungszeit assoziiert.

Als Ausblick, wurde in einer kleinen Patientenzahl die iASPP-Expressionen für die hämatologischen Entitäten ALL und Mastrozytose untersucht. Hier konnte trotz der kleinen Patientenzahlen eine deutlich höhere iASPP-Expression für beide Entitäten verglichen mit der gesunden Kohorte beobachtet werden.

In dieser Arbeit ist es gelungen, einen Zusammenhang zwischen der iASPP-Expression und dem Risikoprofil von akuten myeloischen Leukämien darzulegen, sowie die Relevanz von iASPP als Onkoprotein und Inhibitor von p53 im AML-Zellmodell im Hinblick auf das Proliferationsverhalten sowie die Apoptoseinduktion zu verifizieren. Weiterführende Untersuchungen sowie eine deutliche Erweiterung der untersuchten Patientenzahl sind erforderlich, um den Stellenwert von iASPP in der Risikostratifizierung sowie als Marker für ein Therapiemonitoring zu validieren. Auch als potenzielles Therapietarget für innovative Therapieansätze könnte sich iASPP bei nachgewiesenen signifikant aberranter Expression anbieten. Diesen Ansätzen wird in Folgeprojekten nachgegangen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Onkopedia Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML). Homepage: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>, Zugriff April 2022
- [2] KOMPETENZNETZ LEUKÄMIEN. AML Epidemiologie [Online]. Homepage: <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/aml/epidemiologie>, Zugriff Oktober 2021
- [3] Crowther D, Bateman CJ, Vartan CP, Whitehouse JM, Malpas JS, Fairley GH, Scott RB. Combination chemotherapy using L-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia. *Br Med J.* 1970 Nov 28;4(5734):513-7. doi: 10.1136/bmj.4.5734.513. PMID: 4921703; PMCID: PMC1820017.
- [4] KOMPETENZNETZ LEUKÄMIEN. Häufigkeiten von Leukämien in Deutschland [Online]. Homepage: 2021 <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie>
- [5] Cancer.Net Editorial Board, 01/2021. Leukemia - Acute Myeloid - AML: Statistics. Homepage: <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-acute-myeloid-aml/statistics>, Stand Oktober 2021
- [6] Sulm pipet te – swiss laboratory medicine. Ausgabe 6, Dez 2014
- [7] Fircanis S, Merriam P, Khan N, Castillo JJ. The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: an updated meta-analysis of epidemiological studies. *Am J Hematol.* 2014 Aug;89(8):E125-32. doi: 10.1002/ajh.23744. Epub 2014 May 8. PMID: 24753145.
- [8] Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne CH, Horst HA, Held G, von Lilienfeld-Toal M, Wilhelm S, Kündgen A, Götze K, Rummel M, Nachbaur D, Schlegelberger B, Göhring G, Späth D, Morlok C, Zucknick M, Ganser A, Döhner H, Schlenk RF; German-Austrian AMLSG. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood.* 2011 Feb 17;117(7):2137-45. doi: 10.1182/blood-2010-08-301713. Epub 2010 Dec 2. PMID: 21127174.
- [9] Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, et al.: Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood* 113:1906-1908, 2009.
- [10] Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis

and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424-447. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27895058; PMCID: PMC5291965.

- [11] Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E, Harbott J, Hasle H, Johnston D, Kinoshita A, Lehrnbecher T, Leverger G, Mejstrikova E, Meshinchi S, Pession A, Raimondi SC, Sung L, Stary J, Zwaan CM, Kaspers GJ, Reinhardt D; AML Committee of the International BFM Study Group. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012 Oct 18;120(16):3187-205. doi: 10.1182/blood-2012-03-362608. Epub 2012 Aug 9. PMID: 22879540.
- [12] Gonzales PR, Mikhail FM. Diagnostic and Prognostic Utility of Fluorescence In situ Hybridization (FISH) Analysis in Acute Myeloid Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017 Dec;12(6):568-573. doi: 10.1007/s11899-017-0426-6. PMID: 29064023.
- [13] Dan L. Longo (Autor), Manfred Dietel (Herausgeber), Ulrich Keilholz (Mitwirkende), Antonio Pezzutto (Mitwirkende), Hanno Ries (Mitwirkende), Jalid Sehouli (Mitwirkende) : *Harrisons Hämatologie und Onkologie*. ISBN: 9783940615510.2 016.
- [14] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544. Epub 2016 Apr 11. PMID: 27069254.
- [15] Liersch R, Müller-Tidow C, Berdel WE, Krug U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults--biological significance and clinical use. *Br J Haematol*. 2014 Apr;165(1):17-38. doi: 10.1111/bjh.12750. Epub 2014 Feb 1. PMID: 24484469.
- [16] Schlenk RF, Döhner H. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:324-30. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.324. PMID: 2431919.
- [17] DiNardo CD, Pratz KW, Letai A, Jonas BA, Wei AH, Thirman M, Arellano M, Frattini MG, Kantarjian H, Popovic R, Chyla B, Xu T, Dunbar M, Agarwal SK, Humerickhouse R, Mabry M, Potluri J, Konopleva M, Pollyea DA. Safety and preliminary efficacy of venetoclax with decitabine or azacitidine in elderly patients with previously untreated acute myeloid leukaemia: a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol*.

- 2018 Feb;19(2):216-228. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30010-X. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29339097.
- [18] Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6. doi: 10.1038/358015a0. PMID: 1614522.
- [19] DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 May;76(5):2420-4. doi: 10.1073/pnas.76.5.2420. PMID: 221923; PMCID: PMC383613.
- [20] Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979 May;17(1):43-52. doi: 10.1016/0092-8674(79)90293-9. PMID: 222475.
- [21] Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev*. 1993 Dec;7(12B):2556-64. doi: 10.1101/gad.7.12b.2556. PMID: 8276238.
- [22] Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol*. 1999 Jan;187(1):112-26. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<112::AID-PATH250>3.0.CO;2-3. PMID: 10341712.
- [23] Espinosa JM, Verdun RE, Emerson BM. p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell*. 2003 Oct;12(4):1015-27. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00359-9. PMID: 14580351.
- [24] Shaw PH. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract*. 1996 Jul;192(7):669-75. doi: 10.1016/S0344-0338(96)80088-4. PMID: 8880867.
- [25] Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 1;137(3):413-31. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037. PMID: 19410540.
- [26] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10. doi: 10.1038/35042675. PMID: 11099028.
- [27] Wawryk-Gawda E, Chylińska-Wrzos P, Lis-Sochocka M, Chłapek K, Bulak K, Jędrych M, Jodłowska-Jędrych B. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma*. 2014 May;251(3):525-33. doi:

- 10.1007/s00709-013-0548-1. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24043441; PMCID: PMC3997830.
- [28] Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, Olivier M. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat.* 2016 Sep;37(9):865-76. doi: 10.1002/humu.23035. Epub 2016 Jul 8. PMID: 27328919.
- [29] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul 5;253(5015):49-53. doi: 10.1126/science.1905840. PMID: 1905840.
- [30] Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat.* 2014 Jun;35(6):672-88. doi: 10.1002/humu.22552. PMID: 24665023.
- [31] Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jan;2(1):a001008. doi: 10.1101/cshperspect.a001008. PMID: 20182602; PMCID: PMC2827900.
- [32] Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J.* 2015 Aug 1;469(3):325-46. doi: 10.1042/BJ20150517. PMID: 26205489.
- [33] Heidari N, Abroun S, Bertacchini J, Vosoughi T, Rahim F, Saki N. Significance of Inactivated Genes in Leukemia: Pathogenesis and Prognosis. *Cell J.* 2017 Spring;19(Suppl 1):9-26. doi: 10.22074/cellj.2017.4908. Epub 2017 May 17. PMID: 28580304; PMCID: PMC5448318.
- [34] Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G. Genomic and epigenomic

- landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30;368(22):2059-74. doi: 10.1056/NEJMoa1301689. Epub 2013 May 1. Erratum in: *N Engl J Med*. 2013 Jul 4;369(1):98. PMID: 23634996; PMCID: PMC3767041.
- [35] Joannides M, Grimwade D. Molecular biology of therapy-related leukaemias. *Clin Transl Oncol*. 2010 Jan;12(1):8-14. doi: 10.1007/s12094-010-0460-5. PMID: 20080465.
- [36] Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2008 Aug;22(8):1539-41. doi: 10.1038/leu.2008.143. Epub 2008 Jun 5. PMID: 18528419.
- [37] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jun 9;374(23):2209-2221. doi: 10.1056/NEJMoa1516192. PMID: 27276561; PMCID: PMC4979995.
- [38] Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4325-36. doi: 10.1182/blood-2002-03-0772. Epub 2002 Aug 1. PMID: 12393746.
- [39] Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell*. 2001 Oct;8(4):781-94. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00367-7. PMID: 11684014.
- [40] Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, Trigiante G, Crook T, Hsieh JK, O'Connor DJ, Zhong S, Campargue I, Tomlinson ML, Kuwabara PE, Lu X. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet*. 2003 Feb;33(2):162-7. doi: 10.1038/ng1070. Epub 2003 Jan 13. PMID: 12524540.
- [41] Ge W, Zhao K, Wang X, Li H, Yu M, He M, Xue X, Zhu Y, Zhang C, Cheng Y, Jiang S, Hu Y. iASPP Is an Antioxidative Factor and Drives Cancer Growth and Drug Resistance by Competing with Nrf2 for Keap1

- Binding. *Cancer Cell*. 2017 Nov 13;32(5):561-573.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2017.09.008. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29033244.
- [42] Trigiante G, Lu X. ASPP [corrected] and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Mar;6(3):217-26. doi: 10.1038/nrc1818. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):414. PMID: 16498444.
- [43] Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, Duraisingham S, Crook T, Lu X. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol Cell Biol*. 2004 Feb;24(3):1341-50. doi: 10.1128/MCB.24.3.1341-1350.2004. PMID: 14729977; PMCID: PMC321425.
- [44] Cao L, Huang Q, He J, Lu J, Xiong Y. Elevated expression of iASPP correlates with poor prognosis and chemoresistance/radioresistance in FIGO Ib1-IIa squamous cell cervical cancer. *Cell Tissue Res*. 2013 May;352(2):361-9. doi: 10.1007/s00441-013-1569-y. Epub 2013 Feb 19. PMID: 2342045.
- [45] Li Y, Ahmad A, Sarkar FH. ASPP and iASPP: Implication in cancer development and progression. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2015 Oct 30;61(6):2-8. PMID: 26518890.
- [46] Liu WK, Jiang XY, Ren JK, Zhang ZX. Expression pattern of the ASPP family members in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Onkologie*. 2010;33(10):500-3. doi: 10.1159/000319692. Epub 2010 Sep 20. PMID: 20926896.
- [47] Shijun Li 1, Guangxia Shi, Hong Yuan, Tao Zhou, Qiuping Zhang, Hong Zhu, Xiaoyan Wang. Abnormal expression pattern of the ASPP family of proteins in human non-small cell lung cancer and regulatory functions on apoptosis through p53 by iASPP. PMID: 22552744. DOI: 10.3892/or.2012.1778. *Oncol Rep Jul 2021*.
- [48] Yin L, Lin Y, Wang X, Su Y, Hu H, Li C, Wang L, Jiang Y. The family of apoptosis-stimulating proteins of p53 is dysregulated in colorectal cancer patients. *Oncol Lett*. 2018 May;15(5):6409-6417. doi: 10.3892/ol.2018.8151. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29731851; PMCID: PMC5921073.
- [49] Sullivan, X. Lu: ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *Br J Cancer*, 2007
- [50] Gorina S, Pavletich NP. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science*. 1996 Nov 8;274(5289):1001-5. doi: 10.1126/science.274.5289.1001. PMID: 8875926.

- [51] Slee EA, Gillotin S, Bergamaschi D, Royer C, Llanos S, Ali S, Jin B, Trigiante G, Lu X. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization. *Oncogene*. 2004 Dec 2;23(56):9007-16. doi: 10.1038/sj.onc.1208088. PMID: 15489900.
- [52] Zhang X, Diao S, Rao Q, Xing H, Liu H, Liao X, Wang M, Wang J. Identification of a novel isoform of iASPP and its interaction with p53. *J Mol Biol*. 2007 May 11;368(4):1162-71. doi: 10.1016/j.jmb.2007.03.001. Epub 2007 Mar 7. PMID: 17391696.
- [53] Lu M, Breyskens H, Salter V, Zhong S, Hu Y, Baer C, Ratnayaka I, Sullivan A, Brown NR, Endicott J, Knapp S, Kessler BM, Middleton MR, Siebold C, Jones EY, Sviderskaya EV, Cebon J, John T, Caballero OL, Goding CR, Lu X. Restoring p53 Function in Human Melanoma Cells by Inhibiting MDM2 and Cyclin B1/CDK1-Phosphorylated Nuclear iASPP. *Cancer Cell*. 2016 Nov 14;30(5):822-823. doi: 10.1016/j.ccell.2016.09.019. Erratum for: *Cancer Cell*. 2013 May 13;23(5):618-33. PMID: 27846394.
- [54] Lossos IS, Natkunam Y, Levy R, Lopez CD. Apoptosis stimulating protein of p53 (ASPP2) expression differs in diffuse large B-cell and follicular center lymphoma: correlation with clinical outcome. *Leuk Lymphoma*. 2002 Dec;43(12):2309-17. doi: 10.1080/1042819021000040017. PMID: 12613517.
- [55] Liu D, Ertay A, Hill C, Zhou Y, Li J, Zou Y, Qiu H, Yuan X, Ewing RM, Lu X, Xiong H, Wang Y. ASPP1 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2020 Apr 8;11(4):224. doi: 10.1038/s41419-020-2415-2. PMID: 32269211; PMCID: PMC7142079.
- [56] Kampa KM, Acoba JD, Chen D, Gay J, Lee H, Beemer K, Padiernos E, Boonmark N, Zhu Z, Fan AC, Bailey AS, Fleming WH, Corless C, Felsher DW, Naumovski L, Lopez CD. Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) heterozygous mice are tumor-prone and have attenuated cellular damage-response thresholds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 17;106(11):4390-5. doi: 10.1073/pnas.0809080106. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19251665; PMCID: PMC2657427
- [57] Kampa KM, Bonin M, Lopez CD. New insights into the expanding complexity of the tumor suppressor ASPP2. *Cell Cycle*. 2009 Sep 15;8(18):2871-6. doi: 10.4161/cc.8.18.9474. Epub 2009 Sep 8. PMID: 19657229.
- [58] Chen J, Xie F, Zhang L, Jiang WG. iASPP is over-expressed in human non-small cell lung cancer and regulates the proliferation of lung cancer cells through a p53 associated pathway. *BMC Cancer*. 2010 Dec

30;10:694. doi: 10.1186/1471-2407-10-694. PMID: 21192816; PMCID: PMC3022889.

- [59] Liu Z, Zhang X, Huang D, Liu Y, Zhang X, Liu L, Li G, Dai Y, Tan H, Xiao J, Tian Y. Elevated expression of iASPP in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(5):3381-8. doi: 10.1007/s12032-012-0306-9. Epub 2012 Jul 20. PMID: 22815155.
- [60] Liu ZZ, Kuang WL, Zeng WJ, Xiao JY, Tian YQ. Downregulation of iASPP Expression Suppresses Proliferation, Invasion and Increases Chemosensitivity to Paclitaxel of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma *In Vitro*. *Chin Med Sci J*. 2019 Sep 30;34(3):184-193. doi: 10.24920/003558. PMID: 31601301.
- [61] Wu J, Liang Y, Tan Y, Tang Y, Song H, Wang Z, Li Y, Lu M. CDK9 inhibitors reactivate p53 by downregulating iASPP. *Cell Signal*. 2020 Mar;67:109508. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109508. Epub 2019 Dec 19. PMID: 31866490.
- [62] Cheng Z, Dai Y, Pang Y, Jiao Y, Zhao H, Zhang Z, Qin T, Hu N, Zhang Y, Ke X, Chen Y, Wu D, Shi J, Fu L. Enhanced expressions of FHL2 and iASPP predict poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Cancer Gene Ther*. 2019 Feb;26(1-2):17-25. doi: 10.1038/s41417-018-0027-0. Epub 2018 Jun 18. PMID: 29910468.
- [63] Barbosa K, Li S, Adams PD, Deshpande AJ. The role of TP53 in acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019 Dec;58(12):875-888. doi: 10.1002/gcc.22796. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31393631.
- [64] Agirre X, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Garate L, Montiel-Duarte C, Navarro G, Vázquez I, Zalacain M, Calasanz MJ, Heiniger A, Torres A, Minna JD, Prósper F. ASPP1, a common activator of TP53, is inactivated by aberrant methylation of its promoter in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*. 2006 Mar 23;25(13):1862-70. doi: 10.1038/sj.onc.1209236. Erratum in: *Oncogene*. 2013 Feb 7;32(6):803. PMID: 16314841.
- [65] Schittenhelm MM, Illing B, Ahmut F, Rasp KH, Blumenstock G, Döhner K, Lopez CD, Kampa-Schittenhelm KM. Attenuated expression of apoptosis stimulating protein of p53-2 (ASPP2) in human acute leukemia is associated with therapy failure. *PLoS One*. 2013 Nov 27;8(11):e80193. doi: 10.1371/journal.pone.0080193. PMID: 24312201; PMCID: PMC3842400.

- [66] Kaiser MC. Die Rolle von ASPP1 in akuten myeloischen Leukämien - Expression und Funktion des mit p53 assoziierten Tumorsuppressors, Dissertationsarbeit Medizinische Fakultät Tübingen, 2020.
- [67] Zhang X, Wang M, Zhou C, Chen S, Wang J. The expression of iASPP in acute leukemias. *Leuk Res.* 2005 Feb;29(2):179-83. doi: 10.1016/j.leukres.2004.07.001. PMID: 15607367.
- [68] Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988 Sep 1;48(17):4827-33. PMID: 3409223.
- [69] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995 Jul 17;184(1):39-51. doi: 10.1016/0022-1759(95)00072-i. PMID: 7622868
- [70] Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6. PMID: 3431465
- [71] N Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 2015 Jan 15;439:231-50. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25451956.
- [72] Pfaffl, M. W. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1, 92-94.
- [73] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
- [74] Lacombe F, Durrieu F, Briais A, Dumain P, Belloc F, Bascans E, Reiffers J, Boisseau MR, Bernard P. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1997 Nov;11(11):1878-86. doi: 10.1038/sj.leu.2400847. PMID: 9369421.
- [75] Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia.* 2003 Jan;17(1):120-4. doi: 10.1038/sj.leu.2402740. PMID: 12529668.
- [76] Fiedler W, Kayser S, Kebenko M, Janning M, Krauter J, Schittenhelm M, Götze K, Weber D, Göhring G, Teleanu V, Thol F, Heuser M, Döhner K, Ganser A, Döhner H, Schlenk RF. A phase I/II study of

sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *Br J Haematol.* 2015 Jun;169(5):694-700. doi: 10.1111/bjh.13353. Epub 2015 Mar 29. PMID: 25818407.

[77] Robinson DJ, Patel A, Purdie KJ, Wang J, Rizvi H, Hufbauer M, Ostano P, Akgül B, Chiorino G, Harwood CA, Bergamaschi D. Epigenetic Regulation of iASPP-p63 Feedback Loop in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2019 Aug;139(8):1658-1671.e8. doi: 10.1016/j.jid.2019.01.020. Epub 2019 Jan 30. PMID: 30710576.

[78] Ge W, Wang Y, Zheng S, Zhao D, Wang X, Zhang X, Hu Y. Nuclear iASPP determines cell fate by selectively inhibiting either p53 or NF-κB. *Cell Death Discov.* 2021 Jul 26;7(1):195. doi: 10.1038/s41420-021-00582-1. PMID: 34312379; PMCID: PMC8313550.

[79] Xing HY, Jia YJ, Tang KJ, Tian Z, Chen YR, Rao Q, Wang M, Wang JX. [Effects of transcription factor GATA-2 on transcriptive regulation of iASPP gene]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2013 Jun;21(3):550-5. Chinese. doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2013.03.003. PMID: 23815896.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen Abteilung II für Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie unter der freundlichen Betreuung von PD Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Kampa-Schittenhelm als Betreuerin und PD Dr. med. Marcus Schittenhelm, unter deren wissenschaftlicher Leitung das Labor steht.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm, PD Dr. med. Marcus Schittenhelm, Frau Figen Akmut und Frau Barbara Illing von mir eigenständig und teils mit freundlicher Unterstützung durch alle zuvor genannten Personen durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Die Korrektur des Manuskripts wurde von PD Dr. med. Kampa-Schittenhelm als Betreuerin vorgenommen.

Daten dieser Dissertationsarbeit sind im Rahmen von Posterpräsentationen mit vorheriger Abstractveröffentlichung bei den Jahrestagungen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinischen Onkologie (DGHO) 2015 und 2017 veröffentlicht worden.

Ein Manuskript befindet sich derzeit in Vorbereitung.

Tübingen, den 02.05.2022

Unterschrift